Diagnóstico laboratorial das infecções parasitárias do trato gastrointestinal

Protozoários Intestinais

Profa. Dra. Irene Soares
FCF/USP
2020

Tópicos a serem abordados nessa aula:

1) Entamoeba histolytica e outras amebas intestinais

2) Giardia duodenalis e outros flagelados intestinais

3) Coccídios intestinais

4) Microsporídios

5) Outros protozoários intestinais: *Balantidium coli* (ciliado)

Blastocystis hominis

Protozoários <u>não patogênicos</u> para o homem

- *Entamoeba dispar*
- *Entamoeba moshkovskii* *
- *Entamoeba coli*
- *Entamoeba hartmanni*
- *Entamoeba gingivalis*
- *Entamoeba polecki*
- *Iodamoeba butschlii*
- *Endolimax nana*
- *Pentatrichomonas hominis*
- *Chilomastix mesnili*
- *Retortamonas intestinalis*
- *Enteromonas hominis*

* Morfologicamente idêntica a *Entamoeba histolytica/ E. dispar*

Entamoeba histolytica
e outras amebas intestinais

Complexo *E. histolytica*

***E. histolytica*: invasiva, patogênica**

***E. dispar:* não invasiva, comensal** (?)

» Morfologicamente idênticas

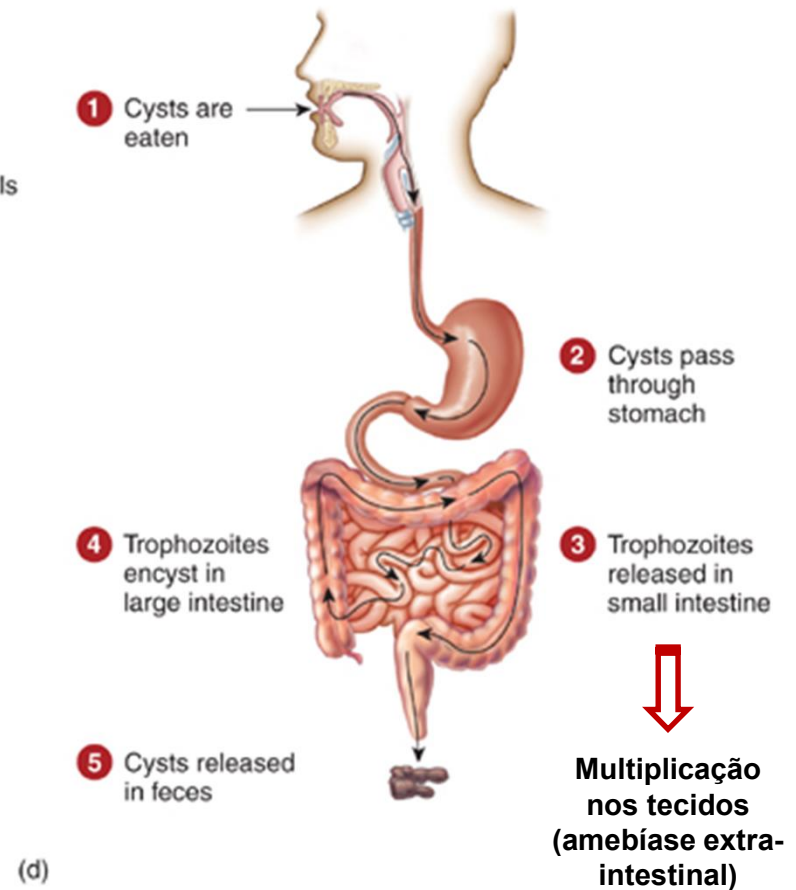
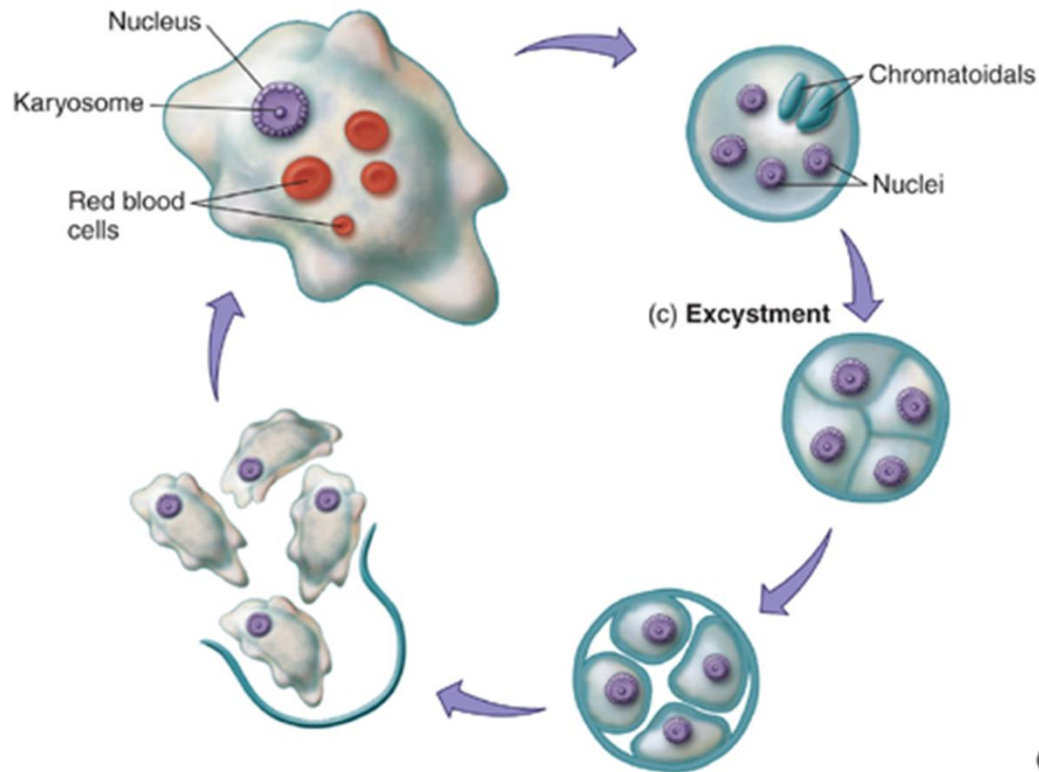
Principais diferenças entre ***E. histolytica* e *E. dispar:***

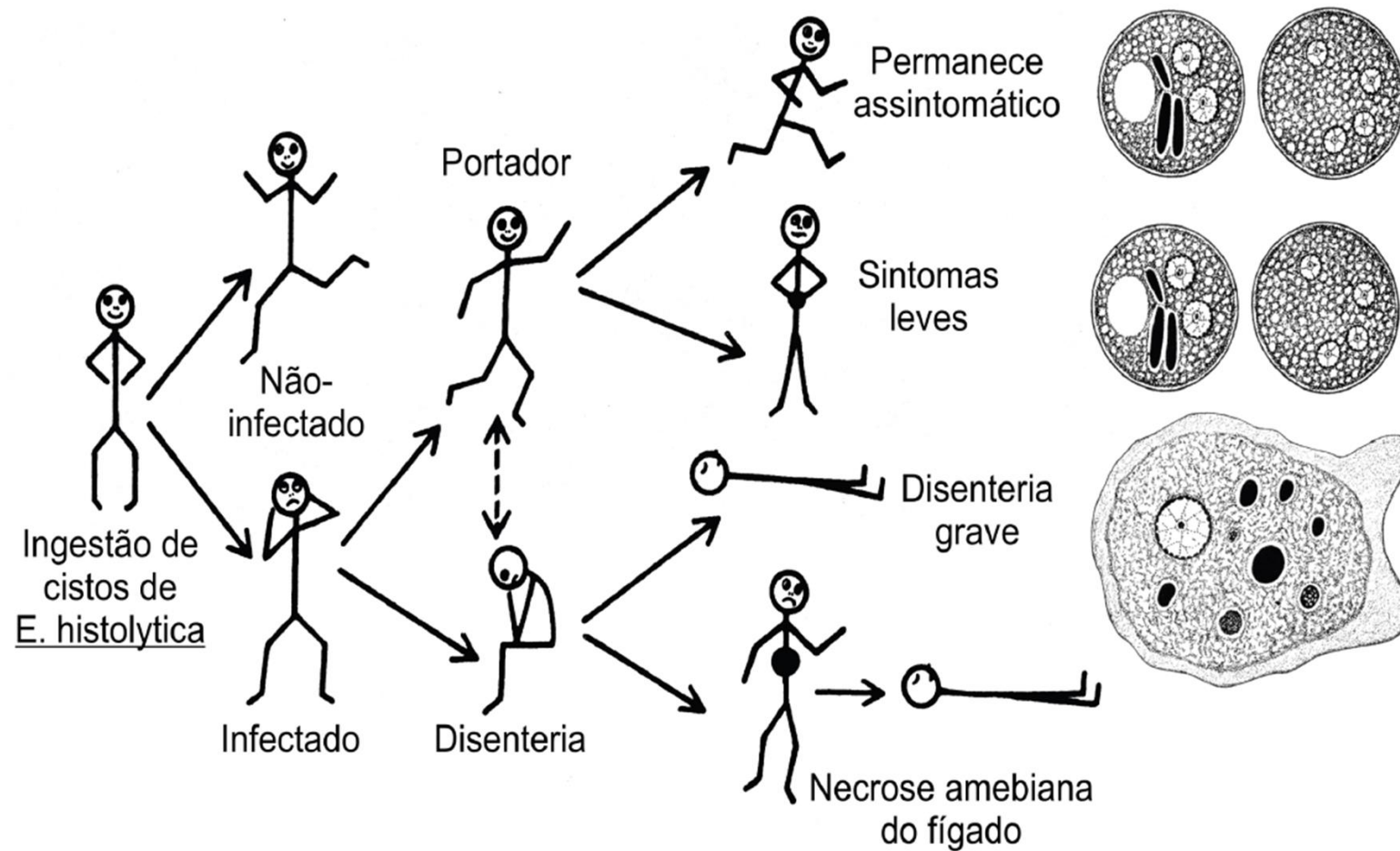
– Bioquímicas: eletroforese de isoenzimas (zimodemas)

– Imunológicas (lectina de adesão inibível por Gal/GalNAC): detectada por anticorpos monoclonais específicos

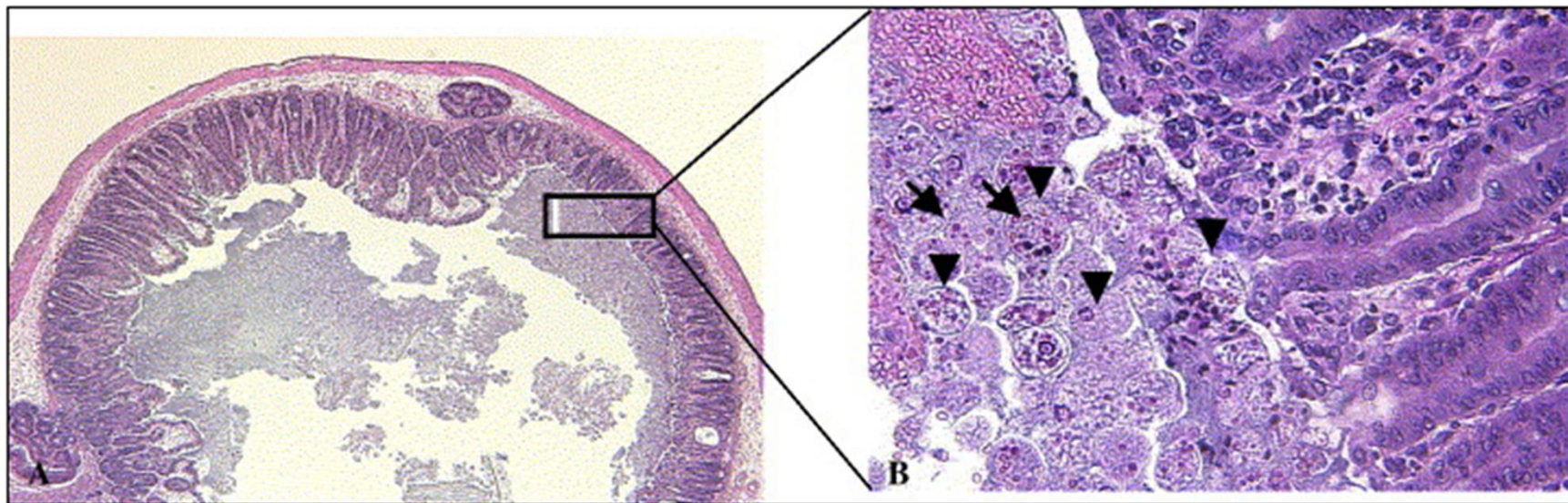
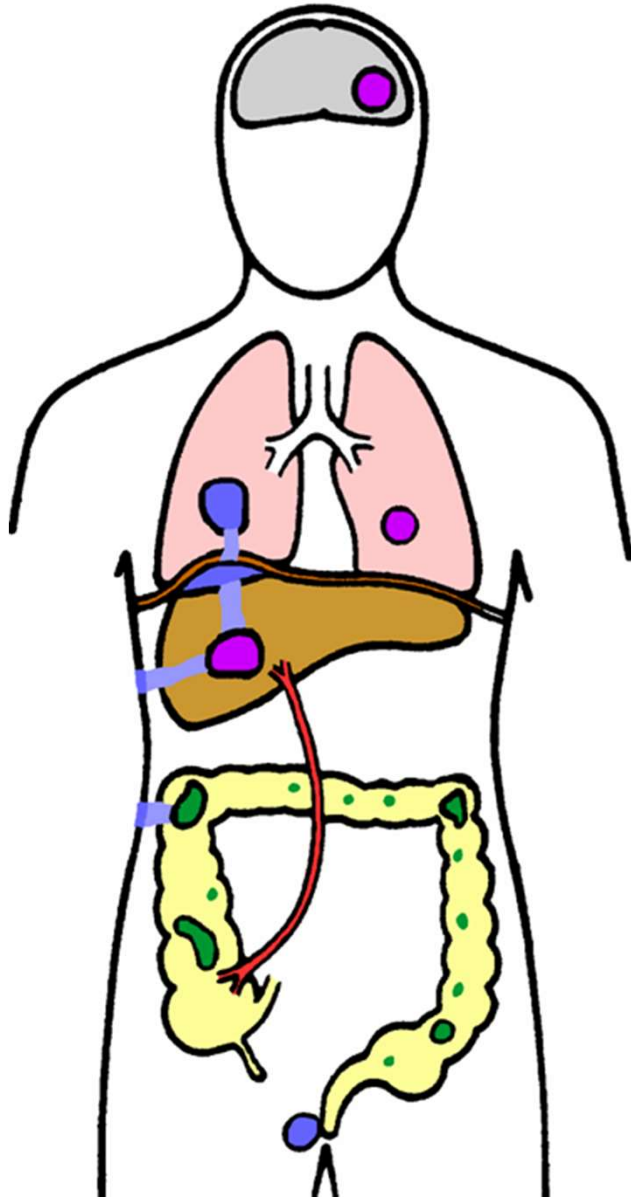
– Genéticas (subunidade 18s de RNAr)

– Epidemiológicas

Estágios evolutivos de *E. histolytica*

História natural da amebíase

Ferreira, Foronda e Schumaker (2003)

Manifestações Clínicas

Amebíase intestinal invasiva:

- Disenteria amebiana (+ comum): aguda, com presença de cólica, diarreia e tenesmo; 8 a 10 evacuações diárias; mucossanguinolenta; febre moderada
- Colite fulminante (0,5% dos casos)
- Apendicite amebiana
- Ameboma do cólon

Amebíase extra-intestinal:

Necrose amebiana de fígado (+ comum): dor, febre, hepatomegalia

Lesões pulmonares e cerebrais (raros)

Lesões cutâneas (região perianal)

Diagnóstico laboratorial

Diagnóstico parasitológico:

- **Exame direto**: a fresco ou corado com lugol

  A fresco: permite observar a motilidade dos trofozoítas* em fezes recém-emitidas (diarréicas) e inclusões (p. ex. hemácias)

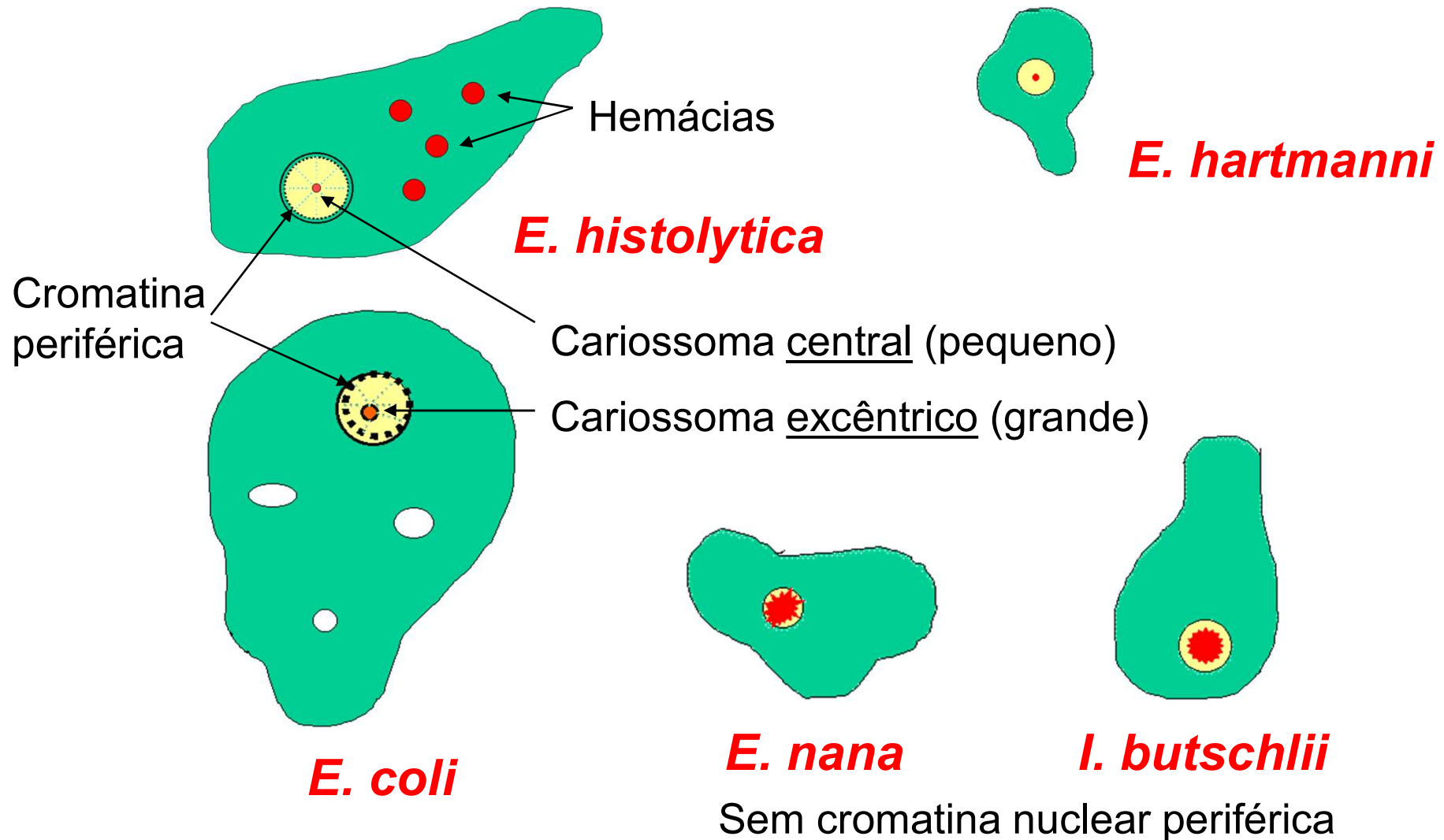
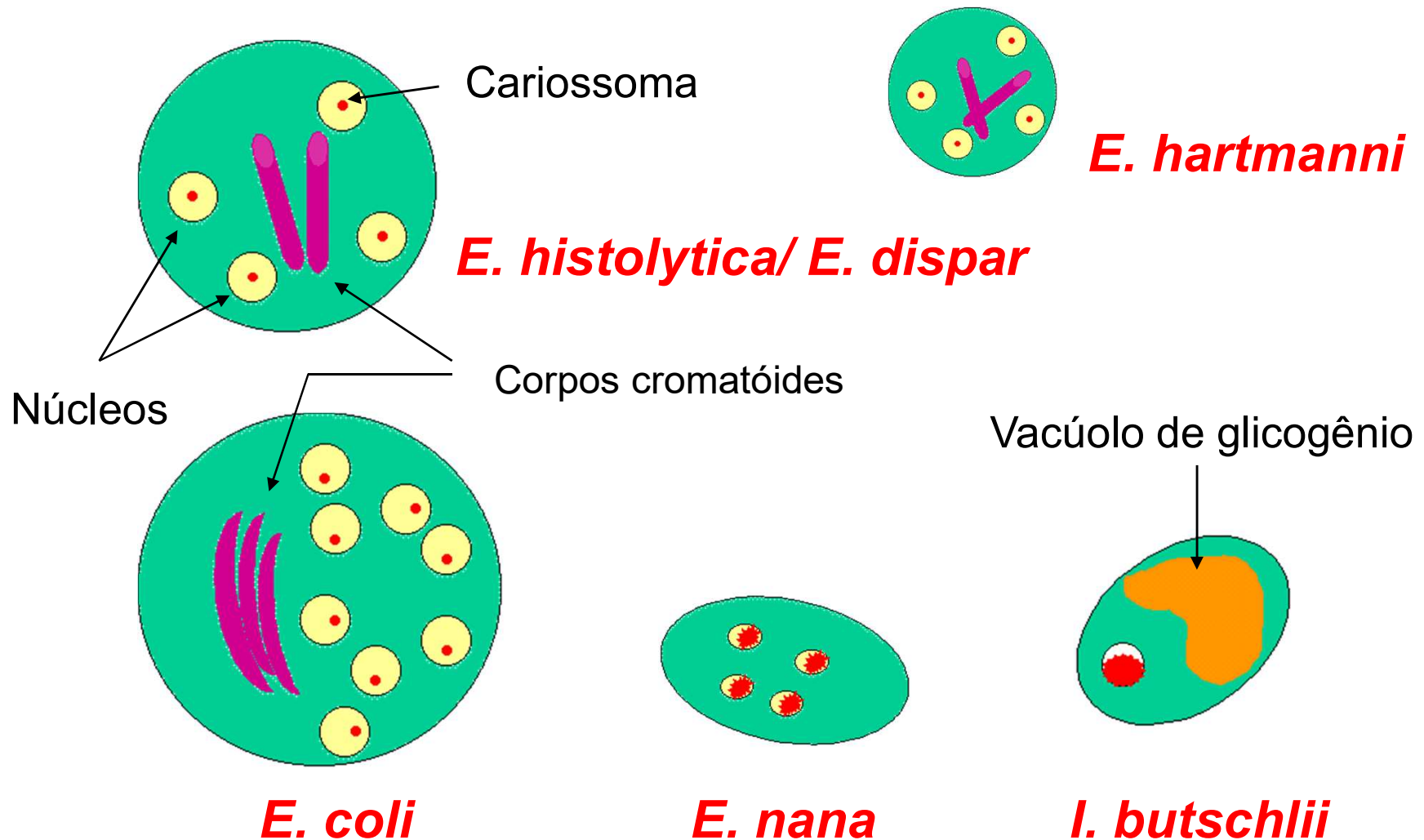
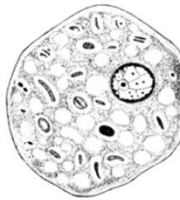
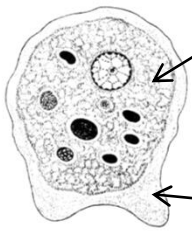
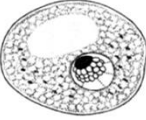
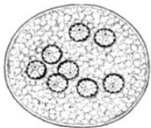
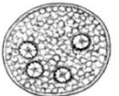
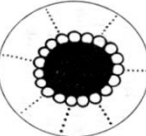
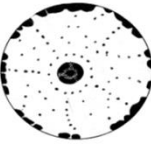
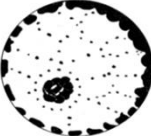
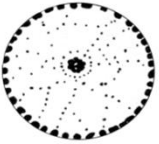
  * diferenciar de macrófagos e células epiteliais

- **Técnicas de Hoffman e Faust:** pesquisa de cistos

- **Métodos de coloração:** Tionina, tricrômico, hematoxilina férrica (fixadas previamente – p. ex. fixador de Schaudinn)

– Pelo menos 3 amostras de fezes recentes devem ser examinadas

– A pesquisa do parasita pode ser feita também a partir de material retirado de ulcerações e em exsudatos (retossigmoidoscopia)

Diferenciação morfológica das amebas
(trofozoítas)

Diferenciação morfológica das amebas
(Cistos)

Diferenciação morfológica entre *E. histolytica* e *E. coli*

	E. histolytica	*E. coli*
Trofozoíta:		
Tamanho	15-60 μm	15-50 μm
Citoplasma	Finamente granulado (ecto e endo)	Granular grosseiro
Hemácias	Às vezes presente	Ausente
Cromatina (perif.)	Delicada e regular	Grosseira
Cariossoma	Pequeno e central	Grande e excêntrico
Cisto:		
Número de núcleos	Até 4	Até 8
Tamanho	10-20 μm	10-35 μm
Corpo cromatóide* (ribossomos)	Bastonete	Feixes ou agulhas

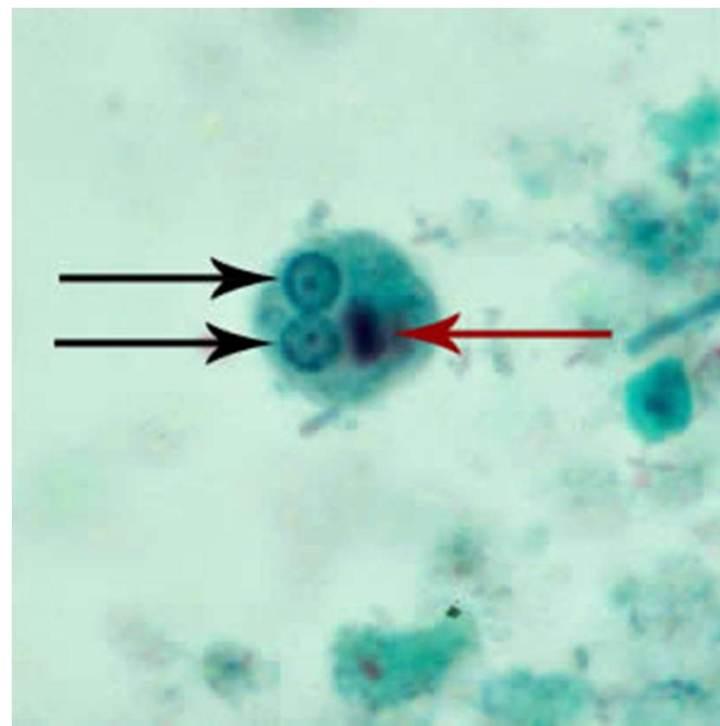
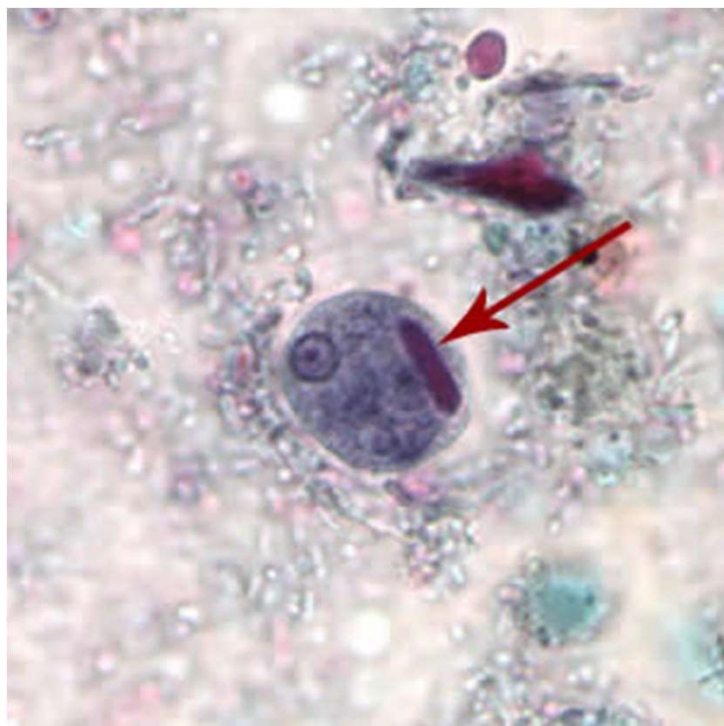
* Em cistos imaturos

Diferenciação morfológica entre Amebas

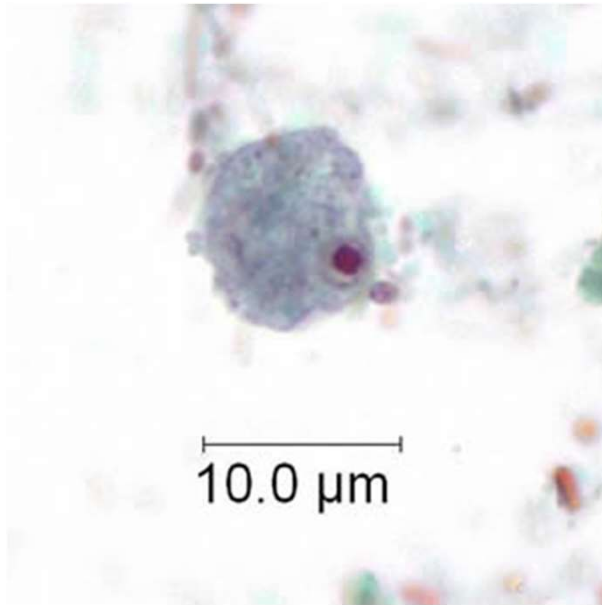
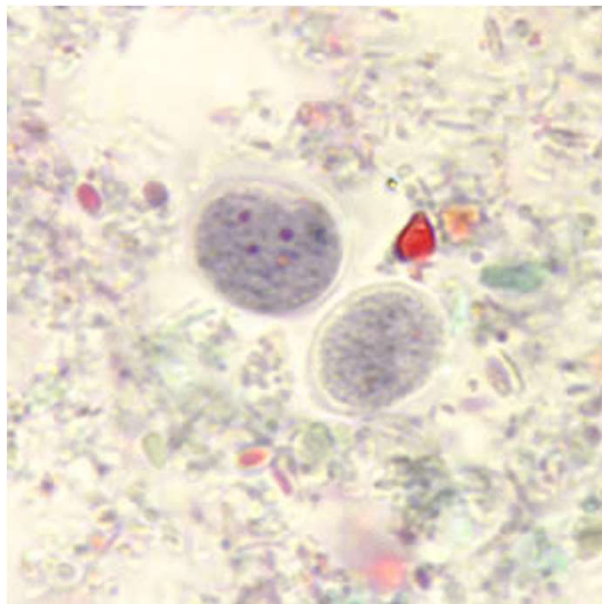
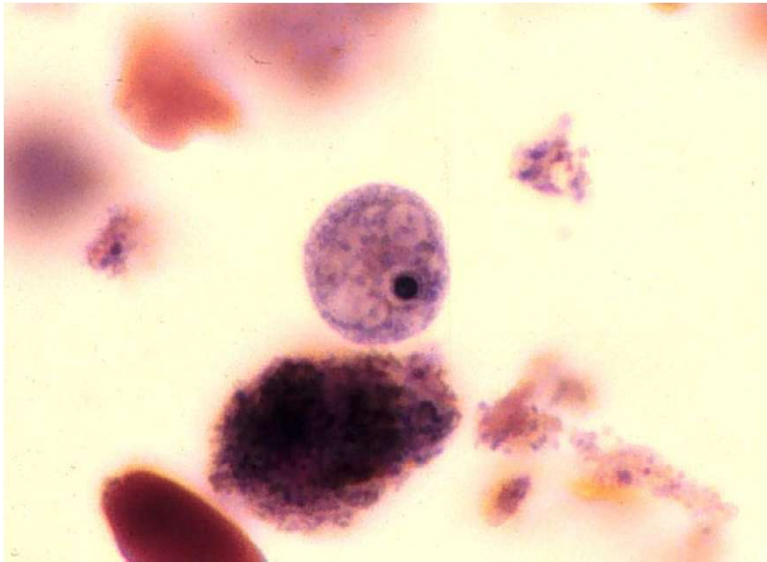
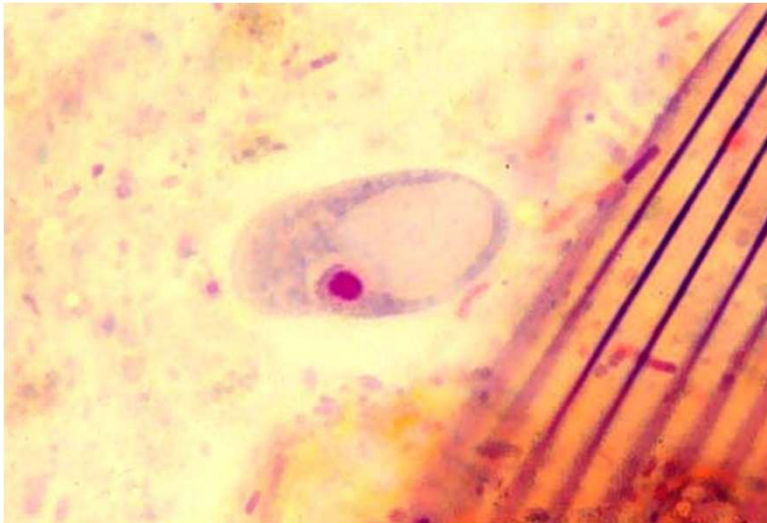
Trofozoíta de *E. histolytica/ E. dispar*
(coloração pela Hematoxilina férrica)

Trofozoítas de *E. histolytica*
(coloração pelo Tricrômico)

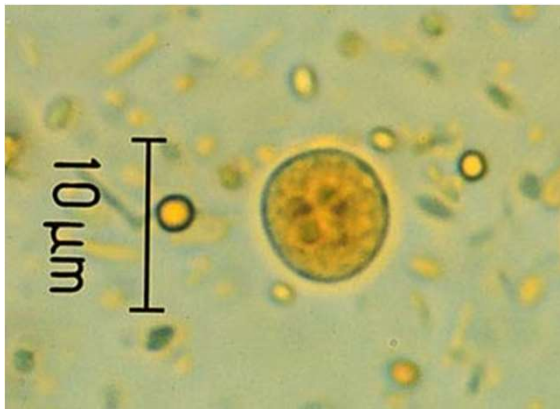
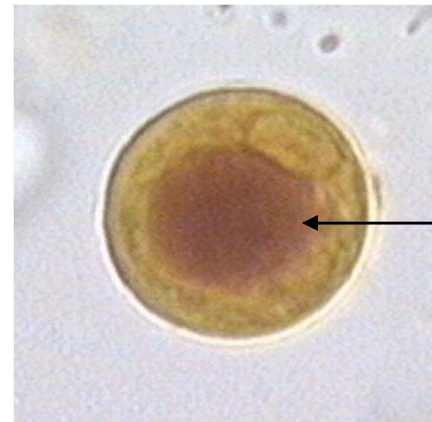
Hemácias

Trofozoíta de *E. histolytica*
(microscopia de contraste
de interferência diferencial)

Cistos de *E. histolytica/ E. dispar*
(coloração pelo Tricrômico)

Trofozoíta de *Entamoeba coli*
(coloração pelo Tricrômico)

Cisto de *E. coli*: c/ 5 núcleos
(coloração pelo Tricrômico)

Trofozoíta de *Endolimax nana*
(coloração pelo Tricrômico)

Cistos de *E. nana*
(coloração pelo Tricrômico)

Trofozoíta de *Iodamoeba butschlii*
(coloração pelo Tricrômico)

Cisto de *I. butschlii*: maduro, uninucleado
(coloração pelo Tricrômico)

Cistos de amebas
(coloração pelo Lugol)

E. coli

E. histolytica/E. dispar

E. nana

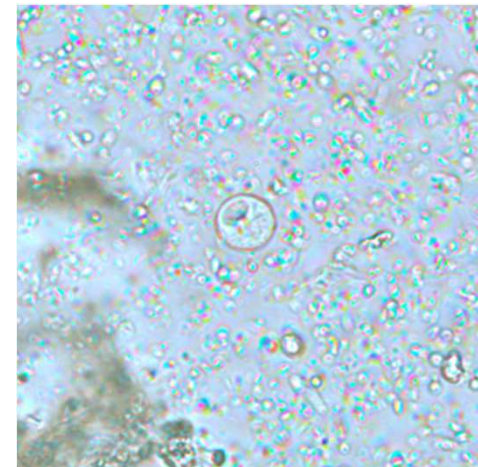
I. bütschlii

Cistos de amebas

(a fresco)

E. coli

E. histolytica/ E. dispar

E. nana

I. bütschlii

<u>Diagnóstico laboratorial</u>

Diagnóstico imunológico:

- **Detecção de antígenos:**

  Material → Fezes, soro ou exsudato de abcesso

  Kits comercialmente disponíveis (ELISA) → Identificação de *E. histolytica/E. dispar* <u>ou</u> *E. histolytica* (anticorpo monoclonal detecta a adesina galactose-específica)

- **Detecção de anticorpos no soro (amebíase extra-intestinal):**
  ELISA (anticorpos anti-lectina) – teste de referência
  Teste de aglutinação em látex (especificidade ↓)

Diagnóstico laboratorial

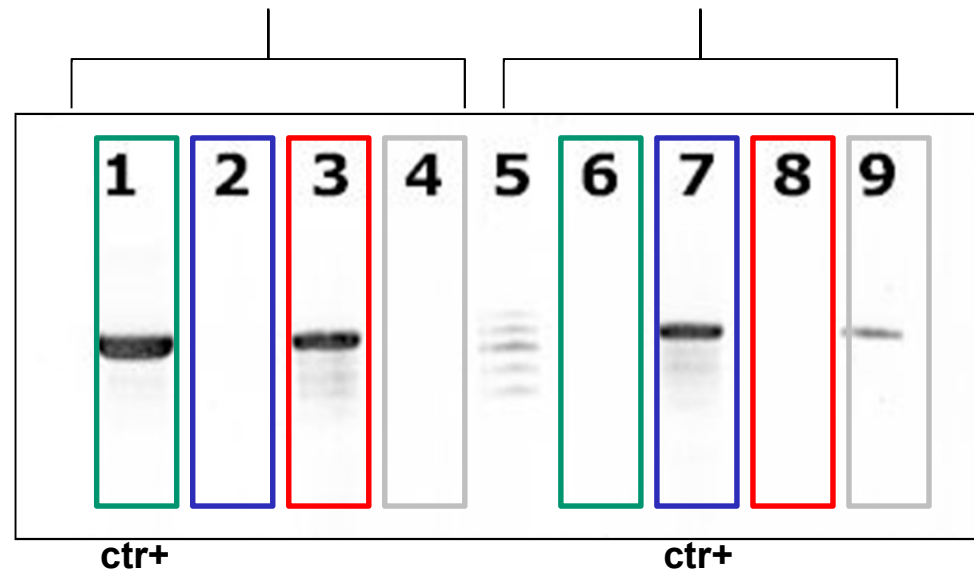
Outros métodos:

- **Cultura e análise de isoenzimas** (*gold standard*)
  → Identificação de *E. histolytica* ou *E. dispar* – 1 a 2 semanas

- **Molecular: Diagnóstico por PCR ou real-time PCR (RNAr)** → Identificação de *E. histolytica* ou *E. dispar* – 1 a 2 dias

- **Exames de imagem (amebíase extra-intestinal):**
  → ultrassonografia ou tomografia computadorizada (fígado)

Diagnóstico Molecular

Primers específicos para:

Lanes 1 - 4: Amplification with the Psp3/Psp5[1] PCR primer pair specific for *E. histolytica*. Diagnostic band size - 876 bp.
Lanes 6 - 9: Amplification with the NPsp3/NPsp5[1] PCR primer pair specific for *E. dispar*. Diagnostic band size - 876 bp.
Lanes 1 and 6: *E. histolytica* 200:NIH, zymodeme II (positive control for *E. histolytica*).
Lanes 2 and 7: *E. dispar* 351:IMMiT, zymodeme I (positive control for *E. dispar*).
Lanes 3 and 8: Specimen from a patient with a liver abscess (positive with *E. histolytica* primers and negative with *E. dispar* primers). *E. histolytica* 333:IMMiT, zymodeme XIV.
Lanes 4 and 9: Specimen from an asymptomatic patient (positive with *E. dispar* primers and negative with *E. histolytica* primers). *E. dispar* 389:IMMiT, zymodeme I.
Lane 5: Molecular base pair standard, 100-bp ladder (from 600 to 1,000 bp).

Giardia duodenalis e outros flagelados intestinais

Flagelados das vias digestivas

Giardia duodenalis, G. lamblia ou G. intestinalis (intestino delgado - duodeno)

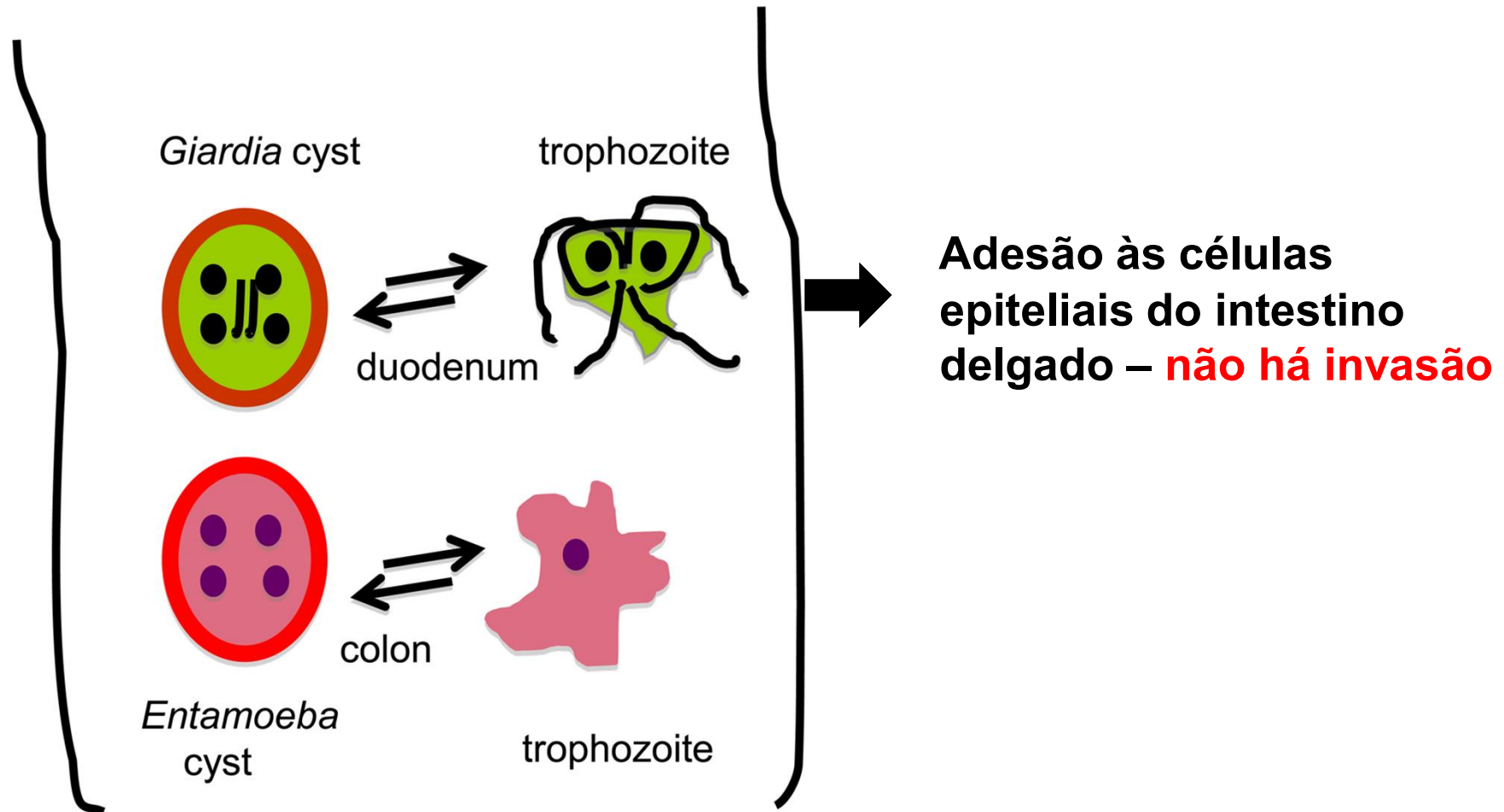
*Chilomastix mesnili, Enteromonas hominis**, *Retortamonas intestinalis**, *Pentatrichomonas hominis, Dientamoeba fragilis* (intestino grosso)

Trichomonas tenax (boca)

* Raramente encontrados

Estágios evolutivos de *Giardia*

Adesão às células epiteliais do intestino delgado – não há invasão

Trends Parasitol. 2011 January;27(1):17-22.

Morfologia

Giardia duodenalis

Forma de pera

Simetria bilateral

20μm x 10μm

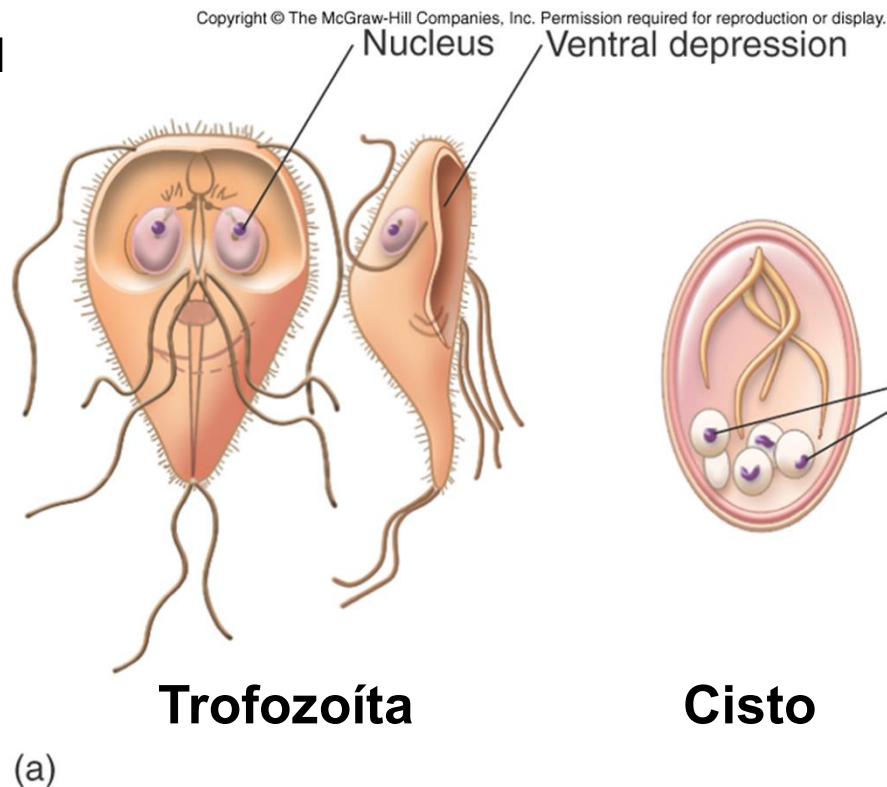
Disco suctorial (ventosa)

Núcleos (2)

Axonema

Corpos parabasais

Flagelos (4 pares)

Trofozoíta **Cisto**

Oval

12μm x 8μm

Núcleos (2 ou 4)

Axonema

Fibrilas

Corpos parabasais

Membrana externa bem destacada do citoplasma

Manifestações Clínicas

- Diarréia: aguda e autolimitada
  crônica e intermitente
- Dor abdominal (periumbilical)
- Perda de peso e fraqueza
- Flatulência
- Náuseas

Giardíase aguda

Giardíase crônica

Lesão dos vilos intestinais com retração das bordas em escova

↓

Má absorção

Diagnóstico laboratorial

Diagnóstico Parasitológico:

- Método direto a fresco ou corado com lugol

  Fezes líquidas → pesquisa de trofozoítas (a fresco)
  Fezes sólidas → pesquisa de cistos

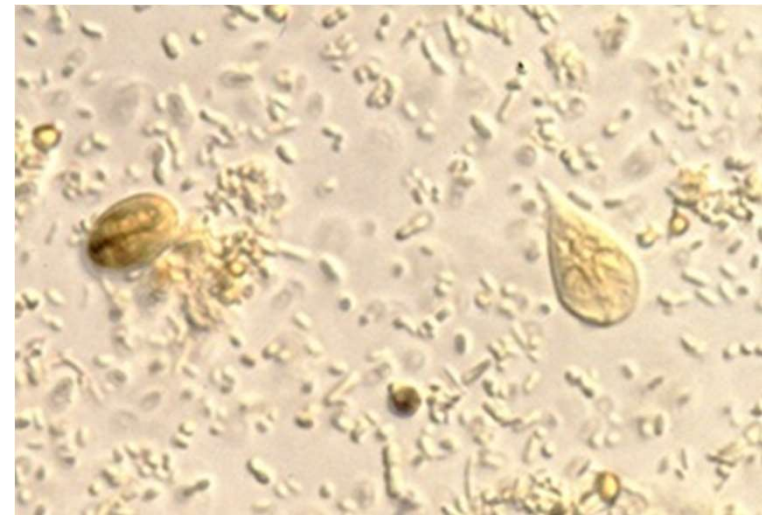
- Técnica de Hoffman e Faust: pesquisa de cistos

- Métodos de coloração: Tricrômico ou Hematoxilina férrica (fixadas previamente – SAF ou fixador de Schaudinn)

– Pelo menos 3 amostras de fezes devem ser examinadas
– Sensibilidade do exame: 1 amostra (50-70%)
  3 amostras (85-90%)

Cisto e trofozoítas

(coloração pela Hematoxilina férrica)

G. duodenalis

Cisto e trofozoíta
(Coloração pelo lugol)

Diagnóstico laboratorial

Diagnóstico Imunológico:

- **Detecção de antígenos** (testes disponíveis comercialmente):

  ELISA, Imunofluorescência e Imunocromatográficos (testes rápidos) ☞ Alta sensibilidade e especificidade

- **Detecção de anticorpos:**
  Imunofluorescência indireta
  ELISA
  Western blot

  ☞ Baixa sensibilidade

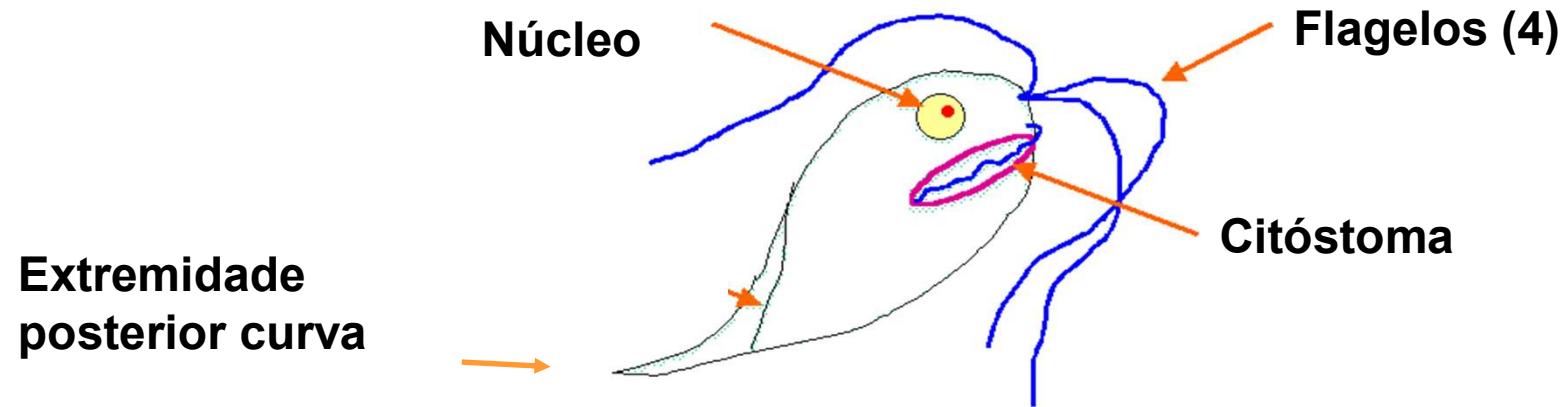
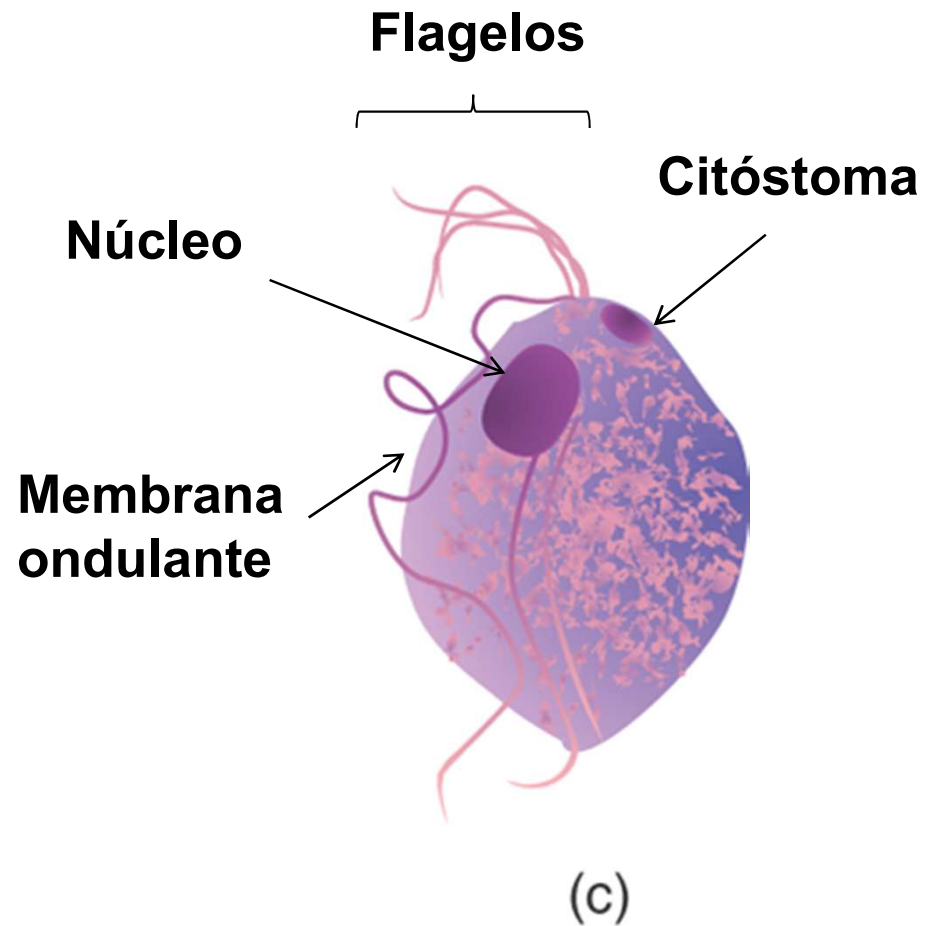
Caracterização molecular de *G. duodenalis*

Agrupamento	Hospedeiros	Espécies propostas
A	Homem e outros mamíferos	*G. duodenalis*
B	Homem e outros mamíferos	*G. enterica*
C	Cães	*G. canis*
D	Cães	*G. canis*
E	Bovinos, suínos e equinos	*G. bovis*
F	Gatos	*G. felis*
G	Roedores	*G. simondi*

Marcadores moleculares: *rRNA, β-giardin, glutamate dehydrogenase (gdh), triose phosphate isomerase (tpi).*

Outros flagelados das vias digestivas

- *Chilomastix mesnili*
- *Pentatrichomonas hominis* (não forma cistos)
- *Dientamoeba fragilis*

Chilomastix mesnili

Pentatrichomonas hominis

Dientamoeba fragilis

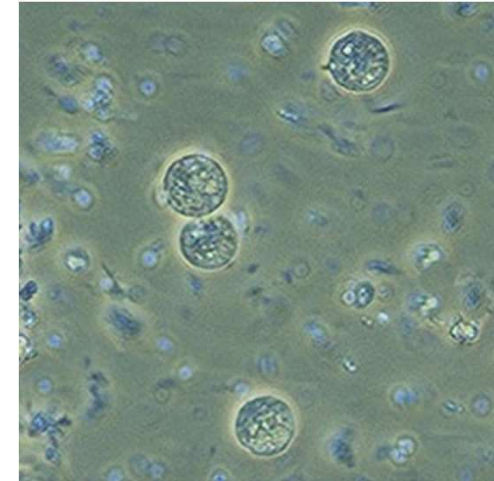
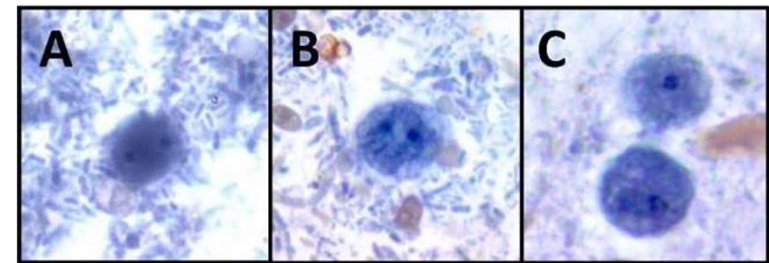
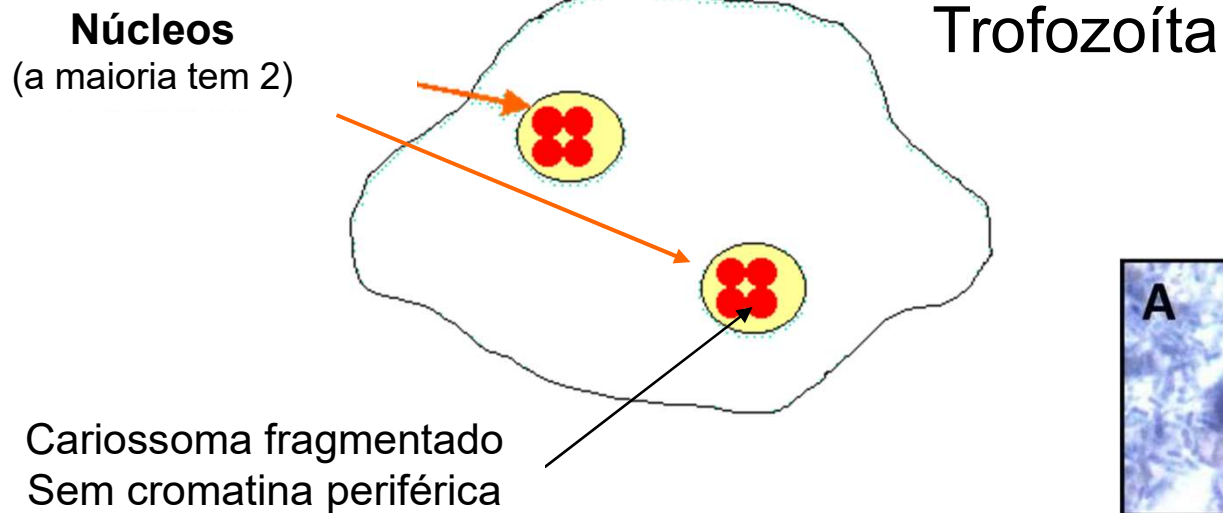
- Foi reclassificado como flagelado com base em dados de microscopia eletrônica e análises filogenéticas (RNAr)
- Não possui flagelos visíveis
- Diversos estudos têm associado a presença de *D. fragilis* com sintomas gastrointestinais, incluindo diarréia crônica

A fresco

Trofozoíta

Núcleos
(a maioria tem 2)

Cariossoma fragmentado
Sem cromatina periférica

A B C

Principais características para identificação de flagelados intestinais em esfregaços corados

Parasita	Forma cistos?	Número de flagelos (trofozoíta)	Número de núcleos (trofozoíta)
G. intestinalis	Sim (oval)	4 pares	2
C. mesnili	Sim (forma de limão)	4	1
E. hominis	Sim (oval)	4	1
R. intestinalis	Sim (forma de pera)	2	1
P. hominis	Não	5	1
D. fragilis	Não (pseudocisto?)	Sem flagelos externos	1-2

Coccídios e Microsporídeos

Coccídios intestinais

- *Cryptosporidium parvum*
- *Cryptosporidium hominis*
- *Isospora belli*

Associados a hospedeiros imunocomprometidos

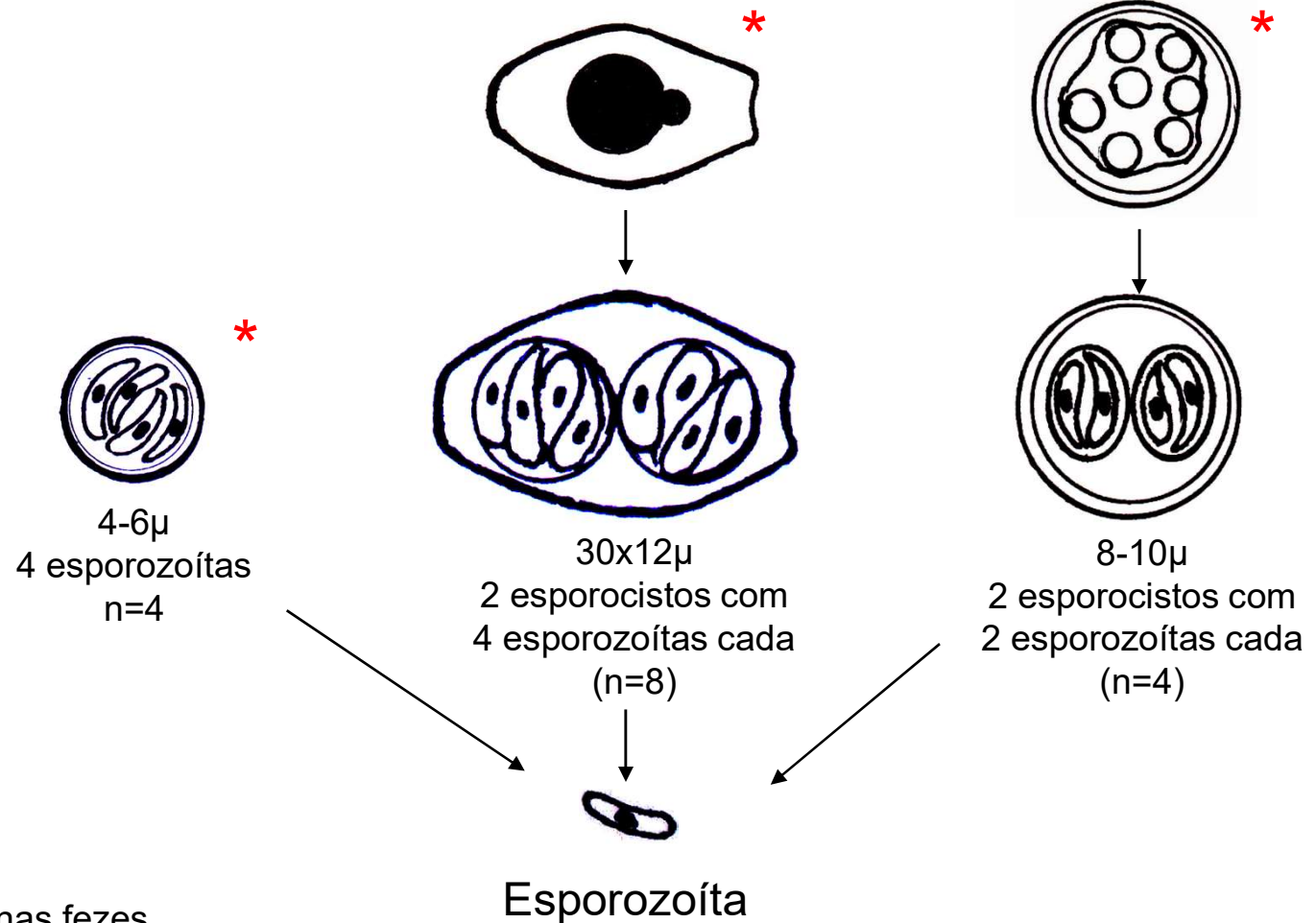
- *Cyclospora cayetanensis*

Associada a quadros diarreicos em viajantes ou a surtos ocasionais em comunidades (ocorrência sazonal)

☞ Todos são parasitas intracelulares obrigatórios (intestino delgado)

Morfologia comparativa dos coccídios intestinais

	Cryptosporidium sp	*Isospora belli*	*C. cayetanensis*
Oocistos não esporulados		*	*
Oocistos esporulados	* 4-6μ 4 esporozoítas n=4	30x12μ 2 esporocistos com 4 esporozoítas cada (n=8)	8-10μ 2 esporocistos com 2 esporozoítas cada (n=4)

Esporozoíta

*Formas encontradas nas fezes

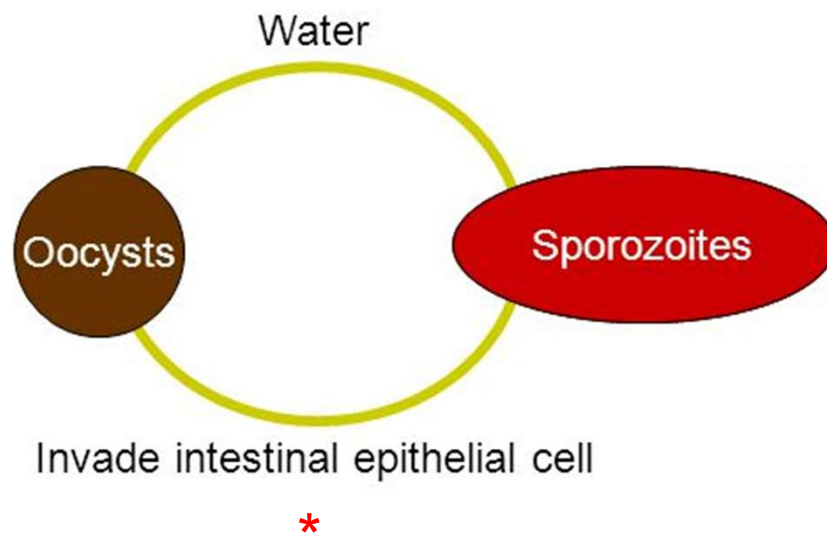
Cryptosporidium sp ~26 espécies

Tabela 1 – Espécies de *Cryptosporidium* e principais hospedeiros

Espécies de *Cryptosporidium*		Principais hospedeiros
Cryptosporidium andersoni	*	Bovinos, camelos (Lindsay *et al.*, 2000)
Cryptosporidium baileyi		Aves (Current *et al.*, 1986)
Cryptosporidium bovis		Bovinos (Fayer *et al.*, 2005)
Cryptosporidium canis	*	Cães (Fayer *et al.*, 2001)
Cryptosporidium fayeri		Canguru vermelho (Ryan *et al.*, 2008)
Cryptosporidium fragile		Anfíbios (Jirku *et al.*, 2008)
Cryptosporidium felis	*	Gatos (Iseki, 1979)
Cryptosporidium galli		Aves (Pavlasek, 1999)
Cryptosporidium hominis	*	Humanos, macacos (Morgan-Ryan *et al.*, 2002)
Cryptosporidium macropodum		Canguru cinza (Power e Ryan, 2008)
Cryptosporidium meleagridis	*	Perus, humanos (Slavin, 1955)
Cryptosporidium molnari		Peixes (Alvarez-Pellitero e Sitjà-Bobadilla, 2002)
Cryptosporidium muris	*	Roedores (Tyzzer, 1910)
Cryptosporidium parvum	*	Bovinos, outros ruminantes, humanos (Tyzzer, 1912)
Cryptosporidium ryanae		Bovinos (Fayer *et al.*, 2008)
Cryptosporidium scophthalmi		Peixes (Alvarez-Pellitero *et al.*, 2004)
Cryptosporidium serpentis		Serpentes (Levine, 1980; Brownstein *et al.*, 1977)
Cryptosporidium suis	*	Suínos (Ryan *et al.*, 2004)
Cryptosporidium varanii		Lagarto-monitor (Pavlasek *et al.*, 1995)
Cryptosporidium xiaoi		Ovinos (Fayer e Santín, 2009)
Cryptosporidium wrairi		Porquinho-da-índia (Vetterling *et al.*, 1971)

Fonte: Fayer (2009) e Fayer e Santín (2009)

* Espécies que podem causar infecção no homem

Formas clínicas da Criptosporidiose intestinal

* Em imunocomprometidos (portadores de AIDS, pessoas em tratamento quimioterápico ou radioterápico e indivíduos com imunodeficiências congênitas) pode ocorrer disseminação extra-intestinal para o fígado, pâncreas e pulmão.

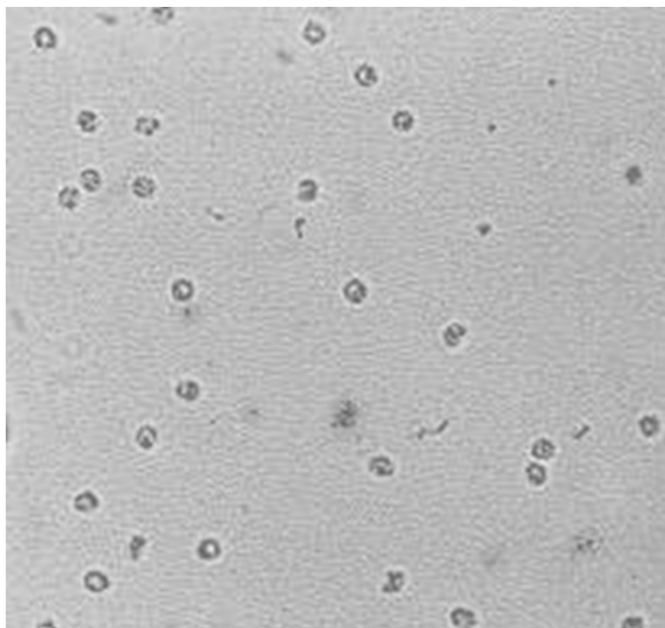
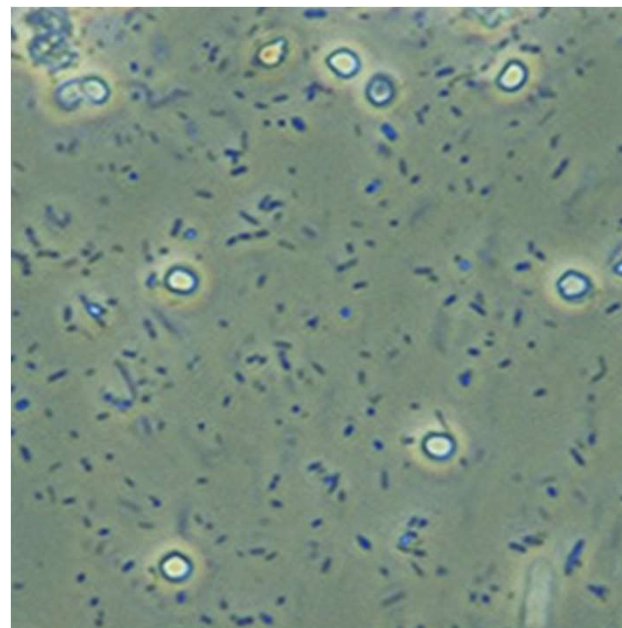
Diagnóstico Laboratorial

Diagnóstico parasitológico:

- Pesquisa de oocistos nas fezes:

  - Técnica de Ritchie → microscopia óptica ou contraste de fase

☞ Há necessidade de examinar múltiplas amostras de fezes
☞ Diagnóstico diferencial com leveduras

- Aspirado duodenal e jejunal → exame histológico (coloração com HE)

Microsocopia óptica

Contraste de fase

Oocistos de *Cryptosporidium*

Diagnóstico Laboratorial

Diagnóstico parasitológico:

- Técnicas de coloração:

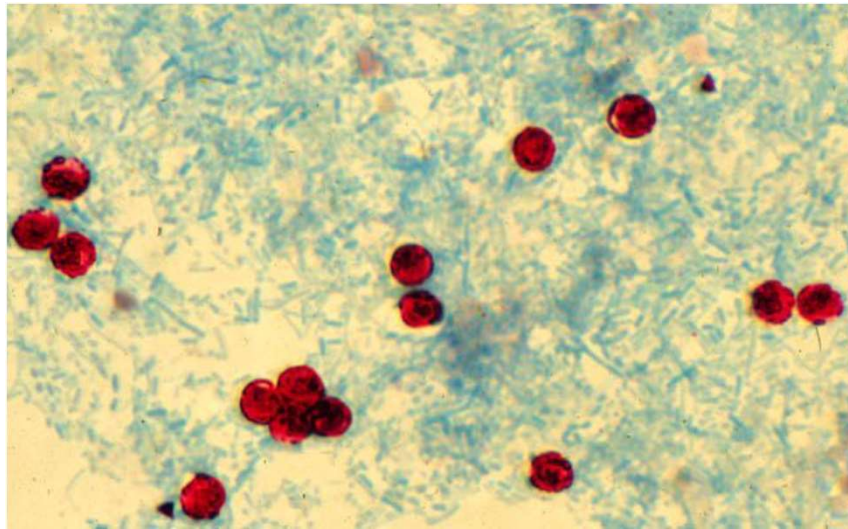
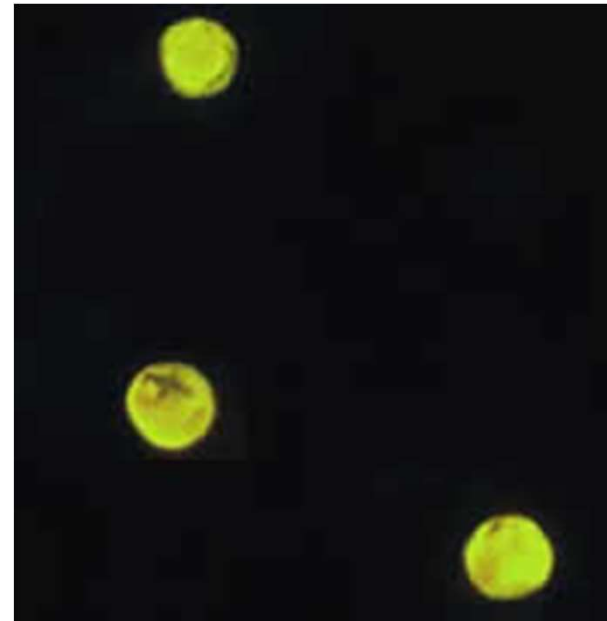
Kinyoun (a frio) ou Ziehl-Neelsen modificado → oocistos de coloração vermelha

Safranina-azul-de-metileno

☞ Leveduras → mesma coloração de fundo da preparação

Auramina-rodamina (corante fluorescente: oocistos alaranjados)

Auramina-fuccina fenicada (oocistos alaranjados)

☞ Leveduras → não se coram

(Técnica de Kinyoun)

(Auramina-rodamina)

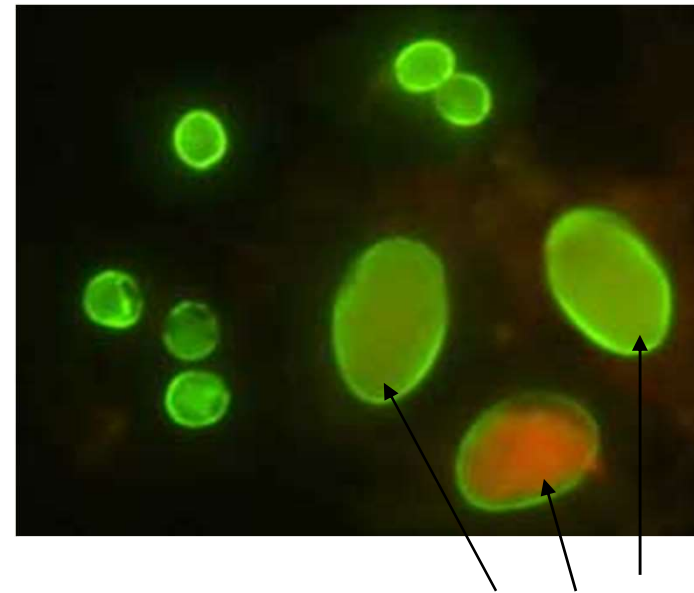
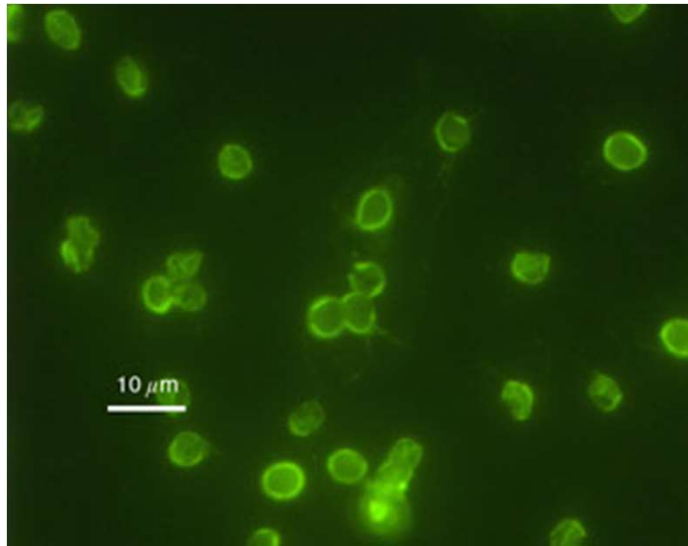
Oocistos de *Cryptosporidium*

Diagnóstico Laboratorial

Diagnóstico imunológico:

- Detecção de antígenos em amostras fecais utilizando-se anticorpos monoclonais

Ensaios imunoenzimáticos: ELISA e imunocromatográficos
Imunofluorescência direta

- Detecção de anticorpos por ELISA

Oocistos de *Cryptosporidium*
(Imunofluorescência direta)

Kits disponíveis comercialmente:

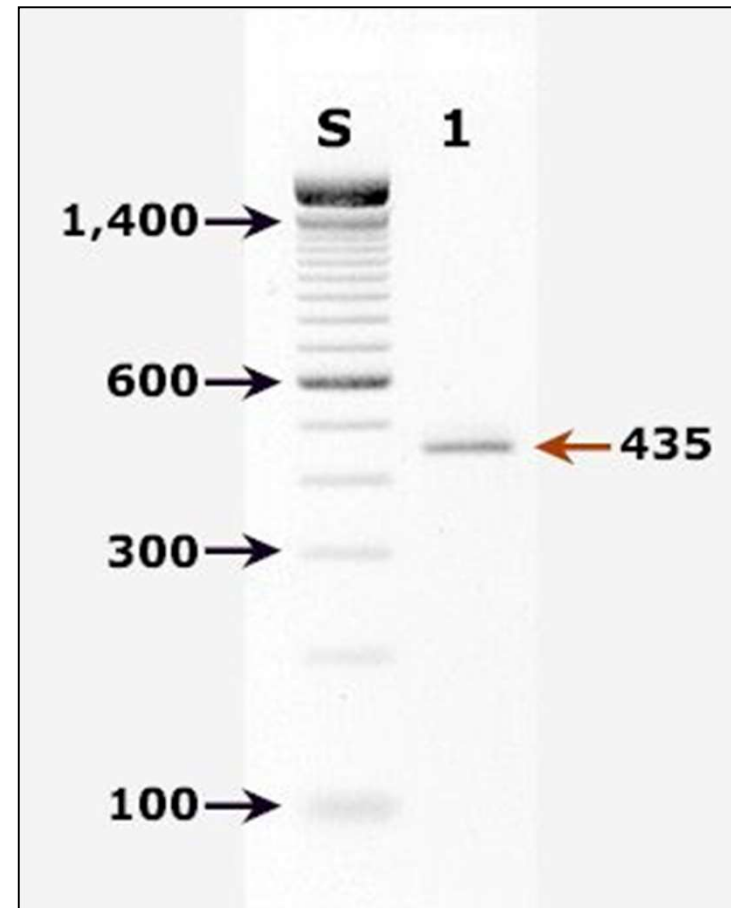
MeriFluor™ *Cryptosporidium*/*Giardia* (Meridian Diagnostics Inc., Cincinnati, OH, 45244, USA); Detect IF *Cryptosporidium* (Shield Diagnostics, Ltd., Dundee DD1 1 SW, Scotland, UK); and Crypto IF Kit (TechLab, Blacksburg, VA, 24060, USA).

Diagnóstico Laboratorial

Diagnóstico molecular
por PCR:

C. hominis: genótipo I → infecta
somente o homem

C. parvum: genótipo II → infecta
o homem e diferentes ⇒
animais (bovino)

☞ morfologicamente idênticos

Isospora belli: Diagnóstico Laboratorial

Diagnóstico parasitológico:

- Pesquisa de oocistos nas fezes:

  - Técnica de Ritchie (+ recomendada) → microscopia óptica (com lugol) ou contraste de fase

  - Técnica de Hoffmann

  ☞ Os oocistos encontrados nas fezes são imaturos (contendo 1 ou 2 esporoblastos)

Autofluorescência: oocistos fluorescem sob luz ultravioleta (UV)
Filtro: 330-380 nm → oocistos de coloração azul

1 esporoblasto

2 esporoblastos

Oocistos imaturos de *Isospora belli*

Oocistos de *I. belli*
(autofluorescência)

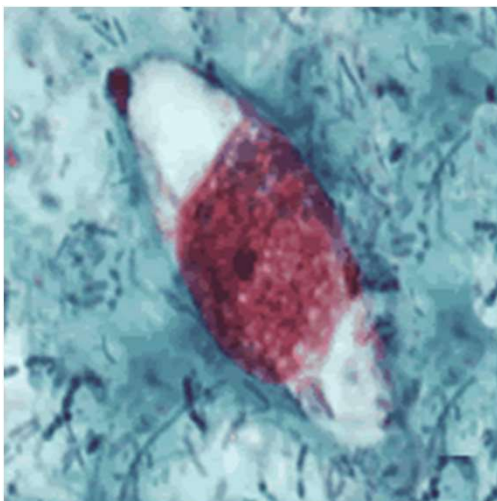
Isospora belli: Diagnóstico Laboratorial

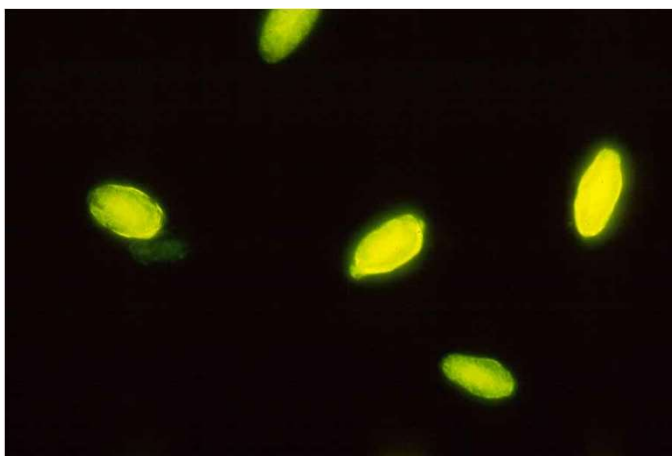
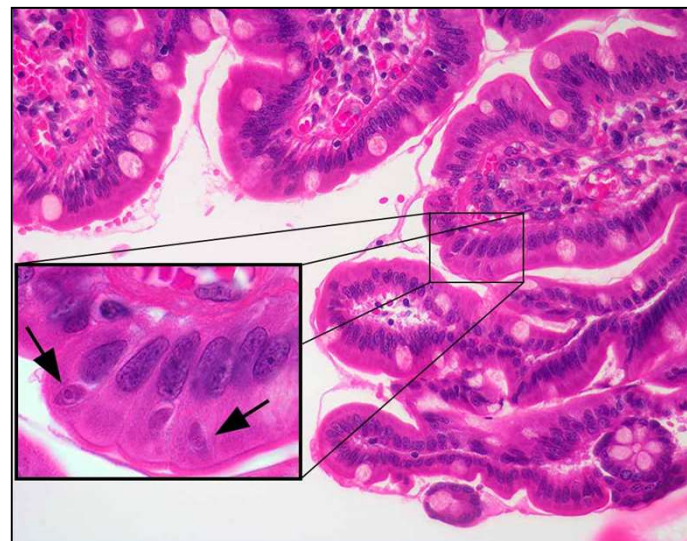
Diagnóstico parasitológico:

- Técnicas de coloração:

  - Kinyoun (a frio) ou Ziehl-Neelsen modificado → oocistos de coloração vermelha
  - Auramina-rodamina → cor amarelo-esverdeada em microscopia de fluorescência

- Pesquisa de oocistos em aspirado duodenal e biliar

- Biópsia intestinal (duodeno)

Técnica de Kynioun

Oocistos de *Isospora belli*

Fluorescência
(Auramina-rodamina)

Biópsia de duodeno

Cyclospora cayetanensis: Diagnóstico Laboratorial

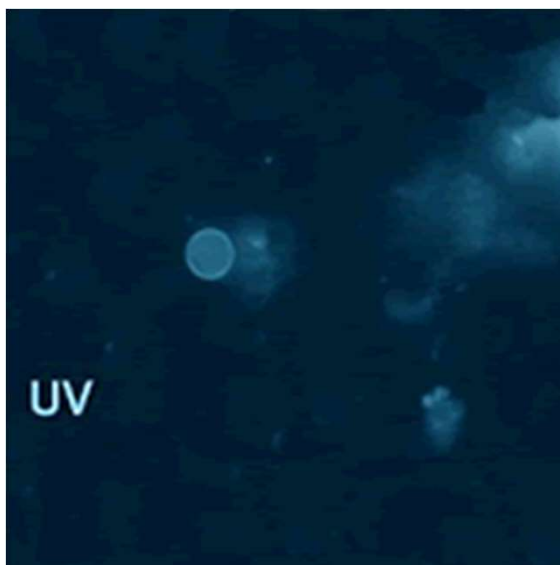
Diagnóstico parasitológico:

- Pesquisa de oocistos nas fezes → técnica de Ritchie

☞O número de oocistos eliminados nas fezes é muito baixo

Microscopia por contraste de fase ou luz UV: autofluorescência
Filtro: 330-365 nm (oocistos de coloração azul)
450-490 nm (oocistos de coloração verde)

Exame a fresco

Exame c/ lugol

Oocistos de *Cyclospora cayetanensis*

Autofluorescência

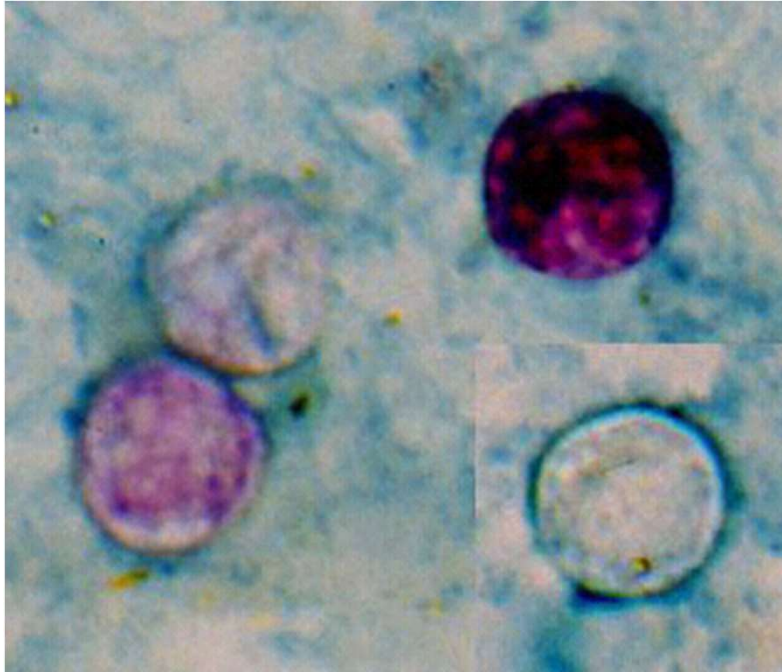
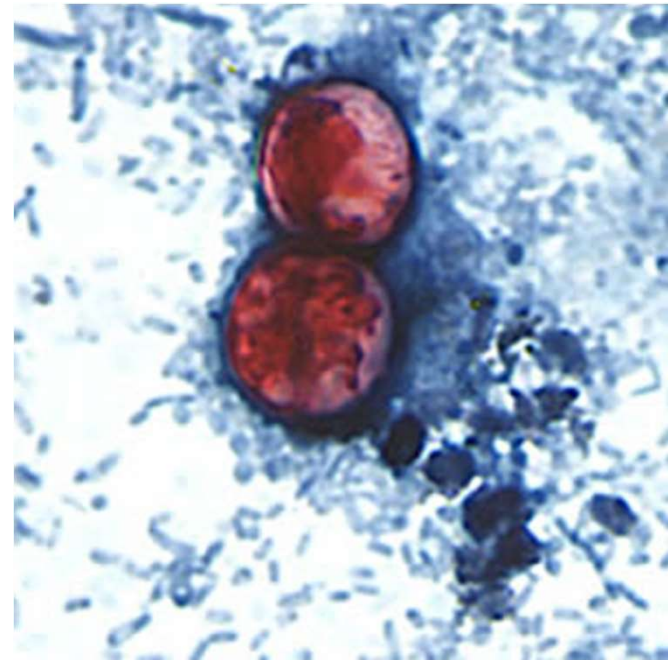
Cyclospora cayetanensis: Diagnóstico Laboratorial

Diagnóstico parasitológico:

- Técnicas de coloração:

Kinyoun → oocistos de coloração vermelha (ácido-resistente-variável)

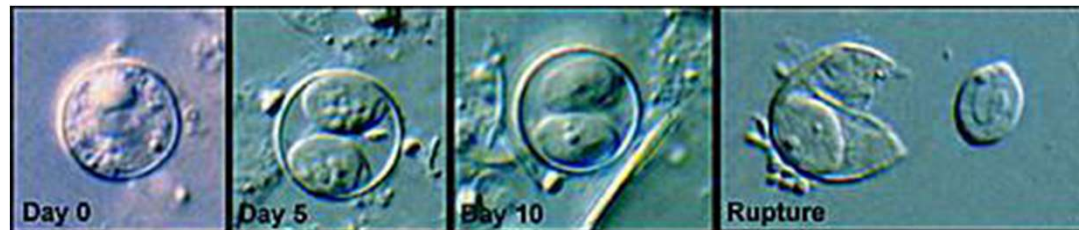
Safranina-azul-de-metileno → oocistos de coloração uniforme

☞ Diagnóstico diferencial com *C. parvum* → tamanho do oocisto / ácido-resistência-variável / necessidade de esporulação

Método de Kinyoun

Safranina-azul-de-metileno

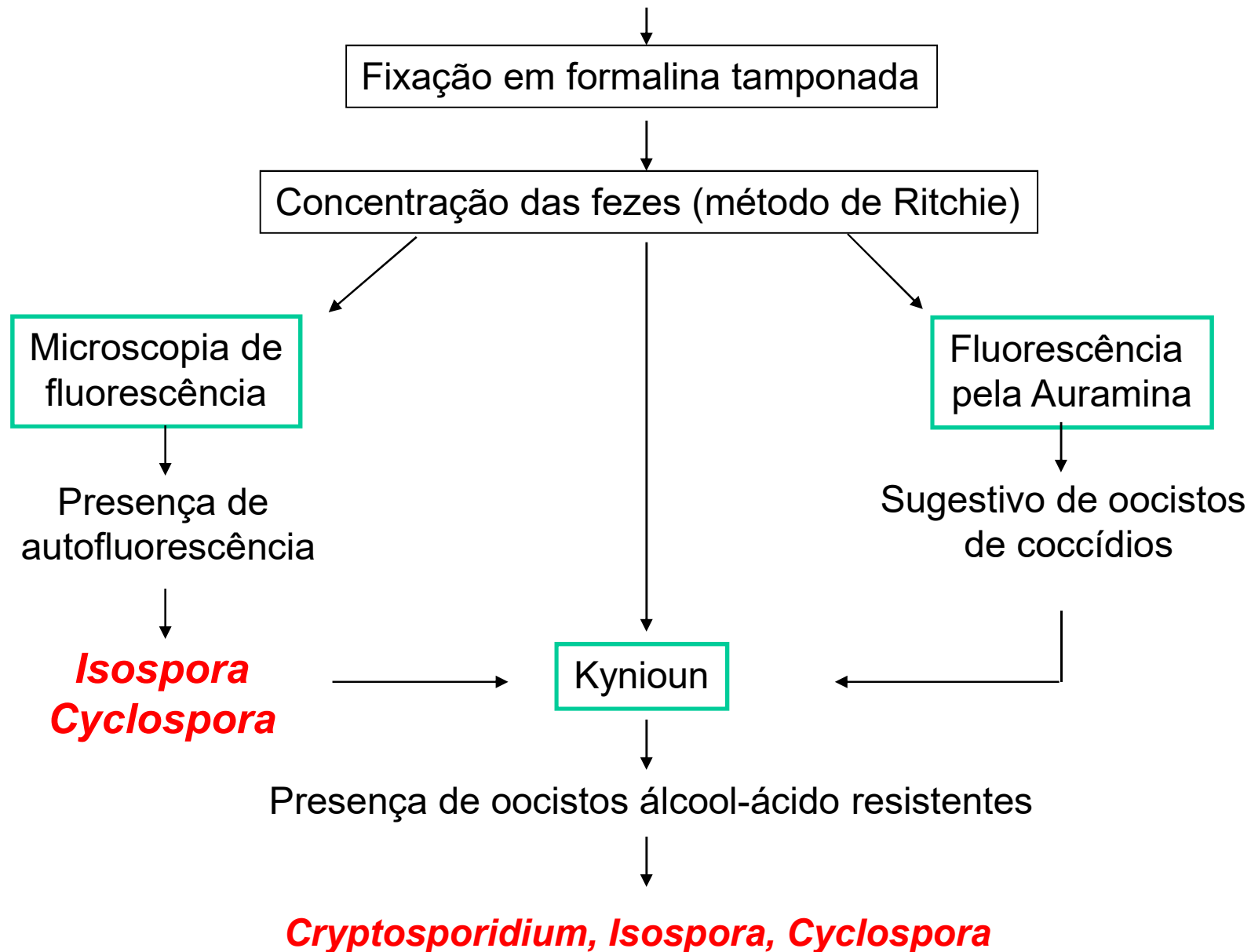
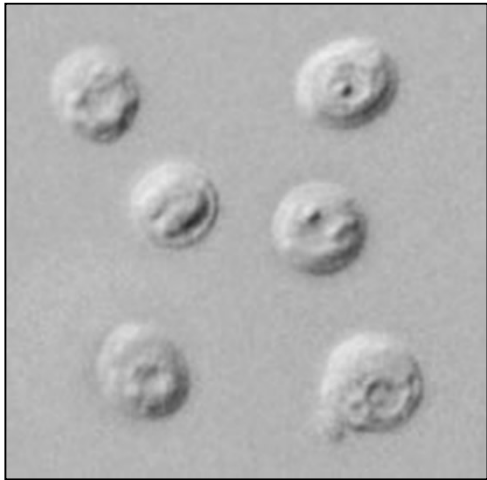
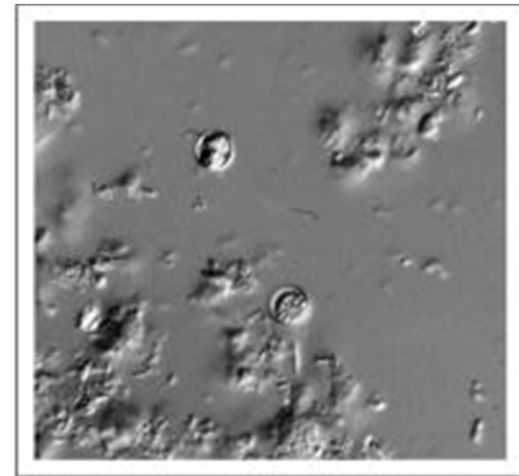
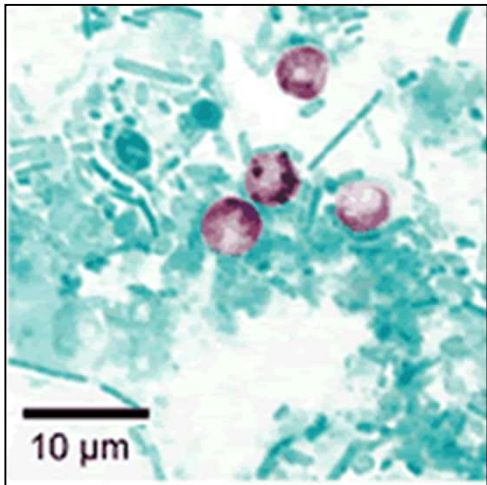
Oocistos de *Cyclospora cayetanensis*

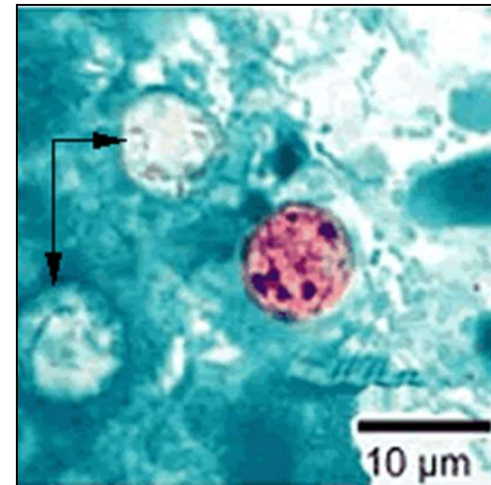
Cyclospora cayetanensis: Diagnóstico Laboratorial

Outros métodos:

• Ensaio de esporulação → dicromato de potássio 2,5%

• Pesquisa de oocistos em aspirados jejunais e biópsias

• Diagnóstico por PCR

Roteiro para diagnóstico de coccídios intestinais

Coccídios intestinais

Nomarski phase microscopy.

Nomarski phase microscopy.

Cryptosporidium

I. belli

C. cayetanensis

Microsporídios

- Parasitas pertencentes ao **Filo Microspora (= Microsporidia)**
  ~ 160 gêneros, > 1300 espécies
- Oito gêneros têm sido descritos como patógenos humanos:

Family	**Genera**	**Species**
Nosematidea	*Brachiola*	*B. algerae, B. vesicularum*
Encephalitozoonidea	*Encephalitozoon*	*E. cuniculi, E. hellem, E. intestinalis (syn. Septata intestinalis).*
Enterocytozoonidea	*Enterocytozoon*	*Enterocytozoon bieneusi* (+ encontrada em todo o mundo),
Microsporidea	*Microsporidium*	*M. ceylonensis, M. africanum*
Nosematidea	*Nosema*	*N. ocularum, N. connori (syn. B connori)*
Pleistophoridea	*Pleistophora*	*Sp.*
Pleistophoridea	*Trachipleistophora*	*T. hominis, T. anthropophthera,*
Nosematidea	*Vittaforma*	*Vittaforma corneae* (syn. *Nosema corneum)*

Microsporidiose

☞ Mais comum em pacientes HIV+ com LT CD4 < 100/mm^3

☞ Em imunocompetentes: pouca ou nenhuma sintomatologia

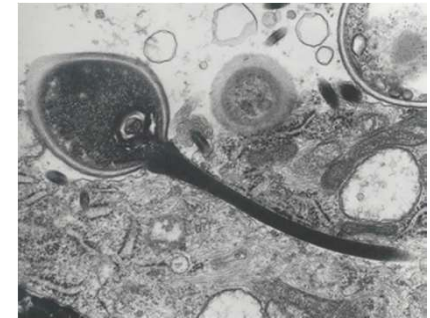
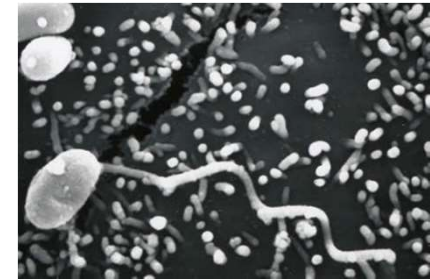
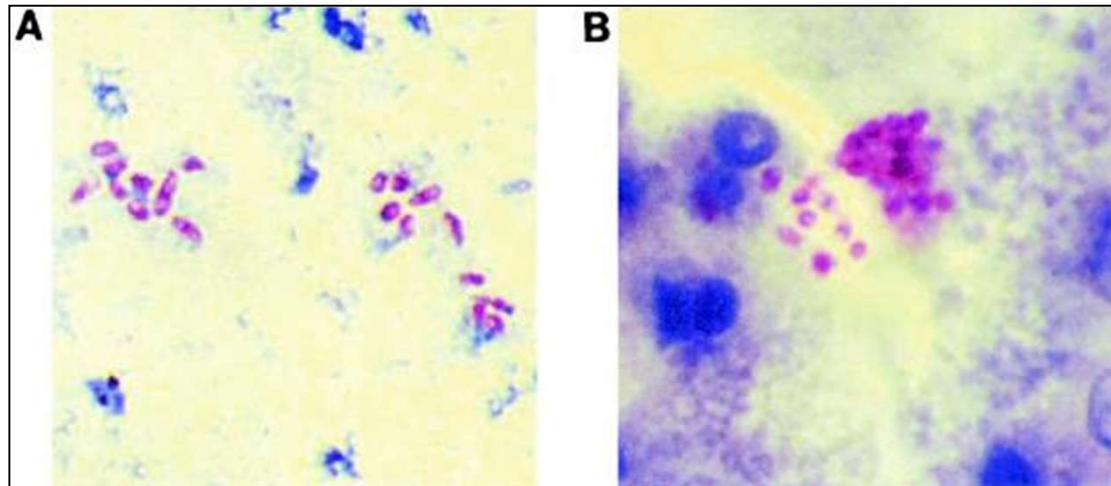
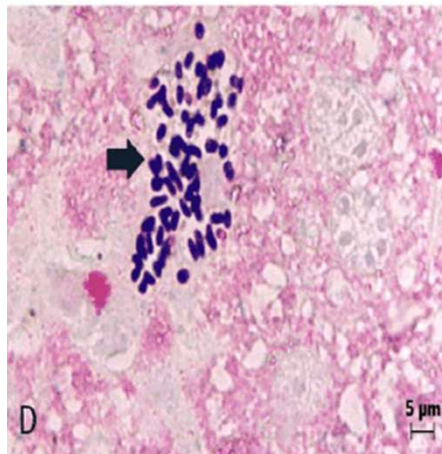
- Infecção do trato gastrointestinal (*E. bieneusi* e *E. intestinalis*)
- Hepatite e Peritonite
- Infecção ocular (ceratoconjuntivite)
- Sinusite
- Infecções pulmonares (traqueobronquite, pneumonia)
- Infecções do trato urinário (cistite, nefrite)
- Miosite
- Infecções cerebrais
- Infecções sistêmicas

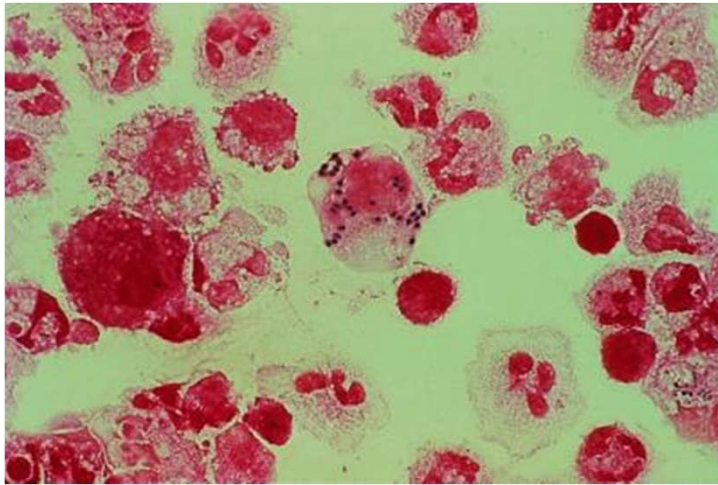
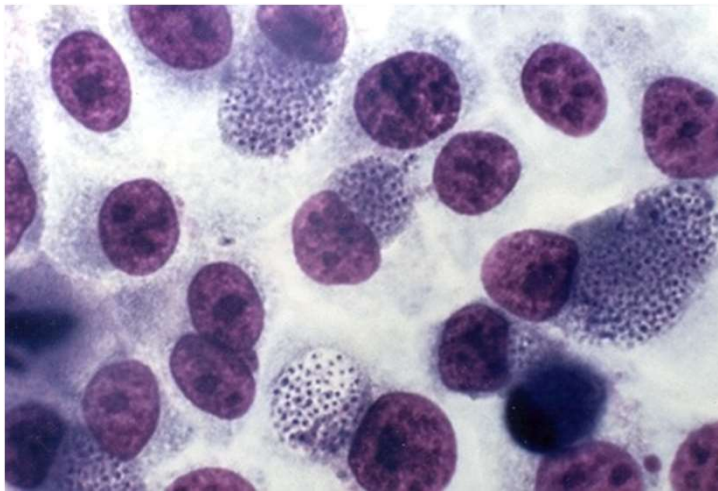
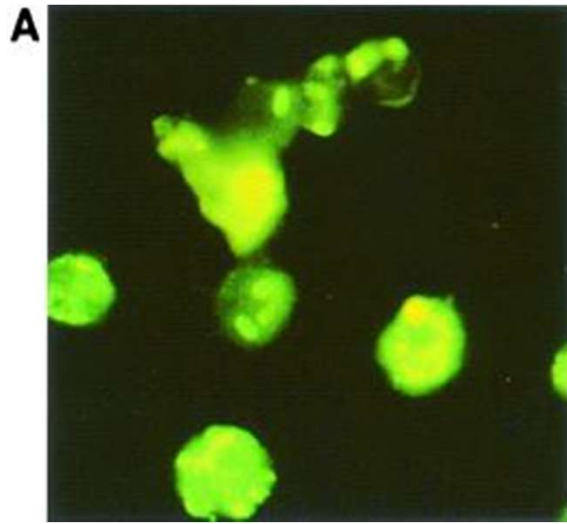
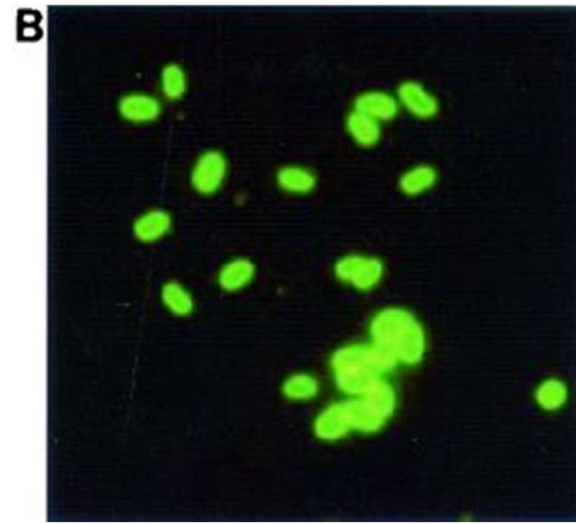
↓ Formas disseminadas

Diagnóstico Laboratorial

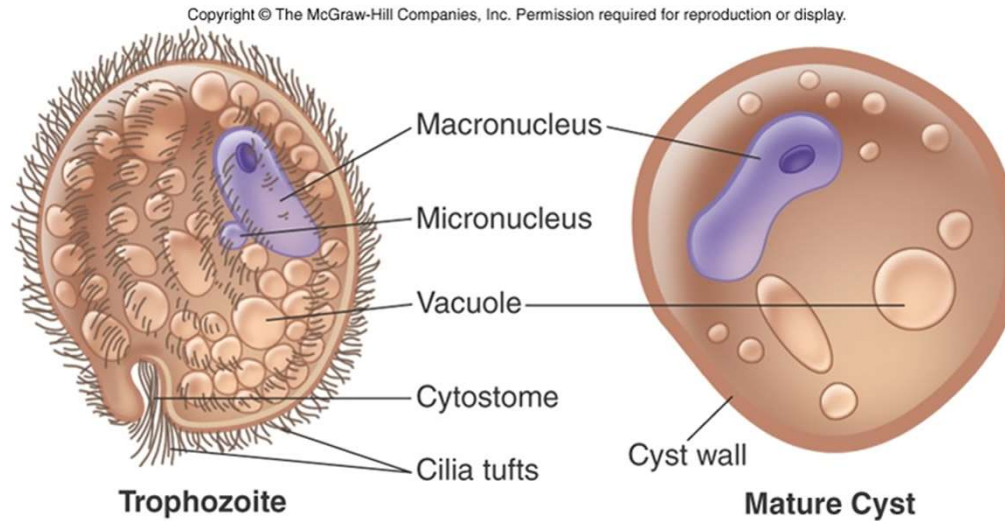
☞ Não são detectados em exames parasitológicos de rotina

Material: fezes, urina, aspirado duodenal, bile, esfregaços conjuntivais e fluidos nasofaringeanos

- Microscopia eletrônica (*gold standard*) ⇒
- Métodos de coloração: Tricrômico
  Gram-Chromotrope
- Reagentes fluorescentes: Calcofluor
  Fungi-Fluor
  Uvitex 2B
- Imunofluorescência direta
- PCR

Esporos maduros de *Encephalitozoon intestinalis*
(ME de transmissão)

Esporos de microsporídios em amostras de fezes (A) e tecido intestinal (B)
(Tricrômico modificado, Ryan-Blue)

Esporos de microsporídios em corte histológico de camundongo
(Gram-Chromotrope)

Esporos de *Encephalitozoon intestinalis* (Calcofluor)

***Esporos de E. bieneusi* em fluido broncoalveolar de um paciente com AIDS** (Coloração de GRAM)

Encephalitozoon intestinalis
(Cultura de células in vitro)

***Encephalitozoon* spp.**
(Imunofluorescência direta)

Outros protozoários intestinais

Balantidium coli (ciliado)

Apresenta o corpo recoberto de cilios

60-100μm x 50-80μm *

Citóstoma

2 núcleos: macro e micronúcleo

Vacúolos digestivos

Esférico

40-60μm *

2 núcleos: macro e micronúcleo

Vacúolos digestivos

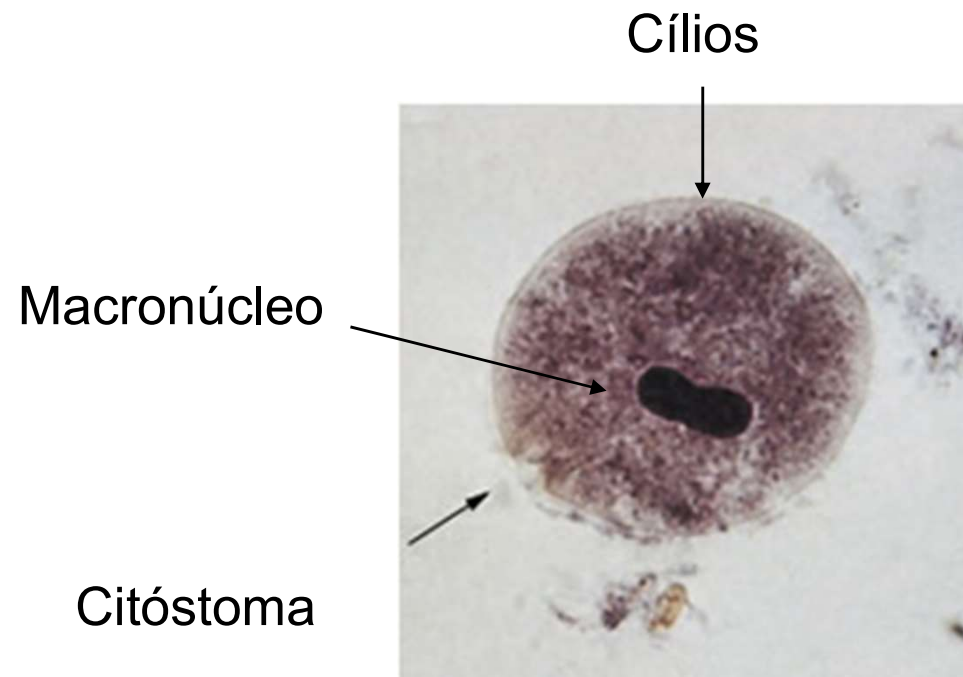
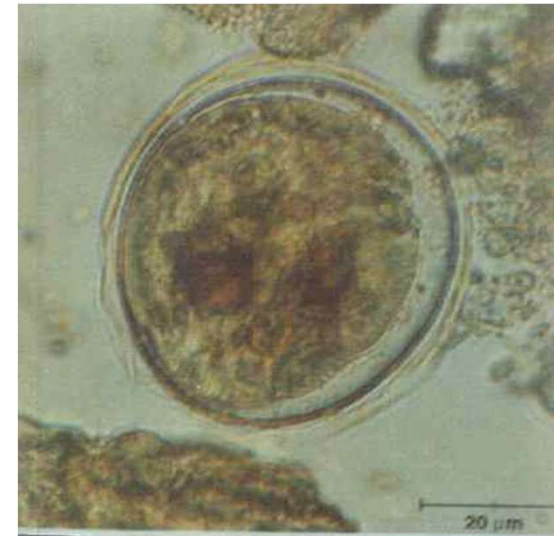
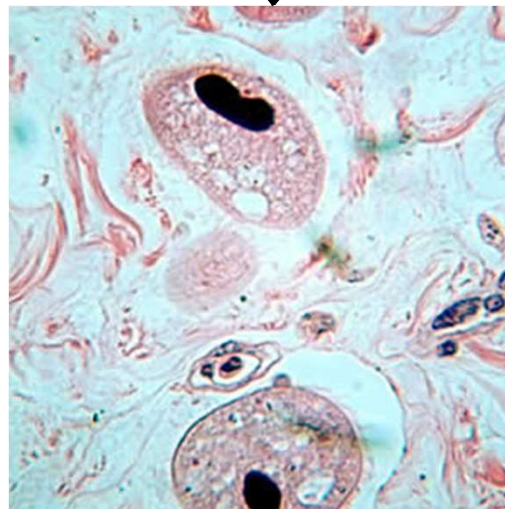
* Maior protozoário parasita e único ciliado patogênico para o homem

Balantidium coli

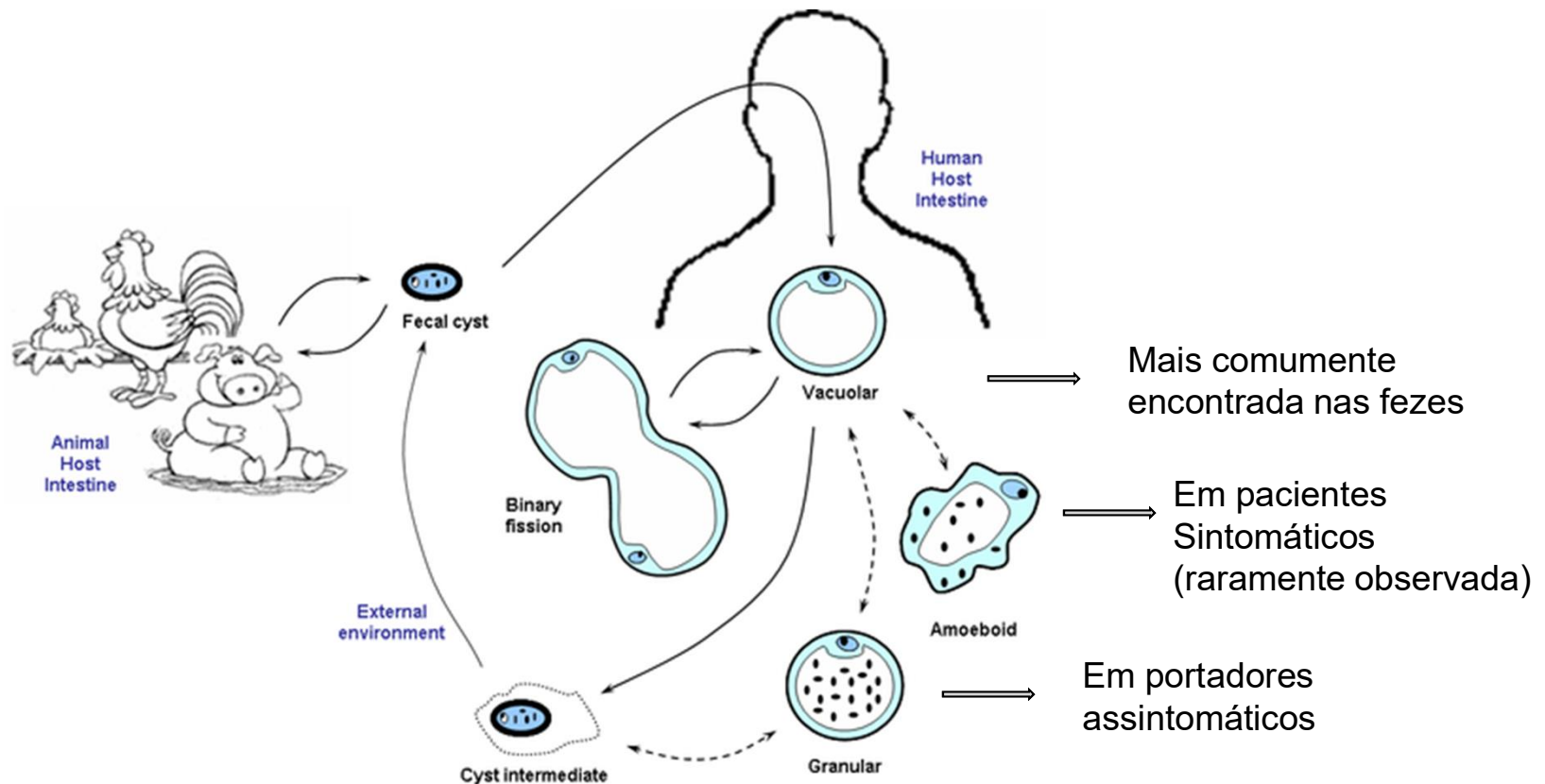
- Assintomáticos (~50% dos casos)
- Sintomáticos:

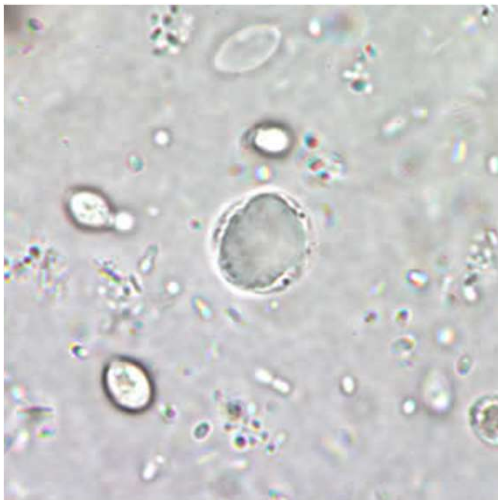
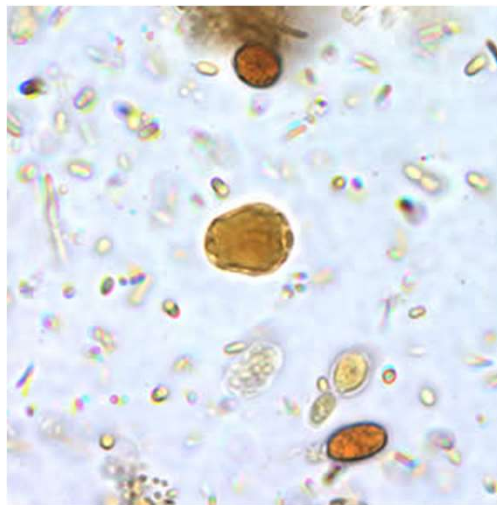
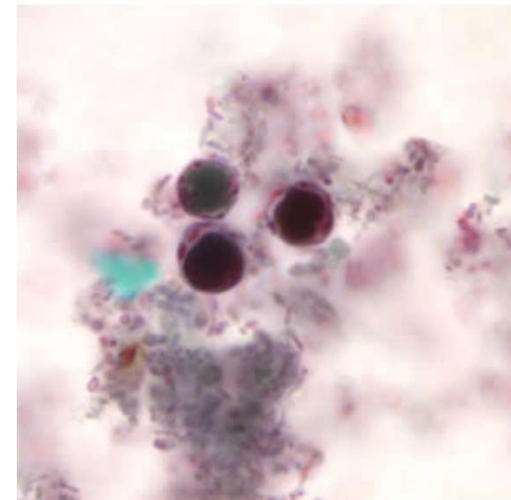
  Disentéricos: quadro clínico semelhante ao de amebíase

  (parasita do intestino grosso)

  Crônicos: com surtos de diarréia
- Pode ocorrer invasão de orgãos extra-intestinais (em geral, pulmão) em indivíduos imunocromprometidos

Trofozoíta de *B. coli*

Cisto de *B. coli*
(Lugol)

Corte de intestino (HE)

Blastocystis hominis

- Considerado por muitos anos como fungo
- Reclassificado como protozoário (1976)
- Organismo polimórfico: vacuolar, granular, amebóide, cística

Blastocystis hominis

- Nos pacientes sintomáticos nos quais outros agentes etiológicos forem excluídos, o *B. hominis* pode ser considerado a causa
- Considerado oportunista em imunodeprimidos
- Técnica de Ritchie → coloração (+ sensível)

A fresco

Lugol

Tricrômico

* diferenciar de leveduras

Sumário dos protozoários que podem causar sintomas intestinais persistentes

Parasita	Diarréia persistente	Dor abdominal persistente	Sangue nas fezes
Entamoeba histolytica	+	+	+
Giardia duodenalis	+	+	-
Dientamoeba fragilis	+	+	-
Balantidium coli	+	+	+
Blastocystis hominis	(+)	(+)	-
Cryptosporidium	+	+	-
Cyclospora cayetanenensis	+	-	-
Isospora belli	+	(+)	-
Microsporídios	+	+	-

+ risco existente, (+) baixo risco, - sem risco

Protozoários causadores de diarréia persistente